

Untersuchungen über die van Urk'sche Farbreaktion β -substituierter Indole

Dissertation
Hans-Werner Dibbern
Mainz 1961

Untersuchungen über die van. U r k ' sche Farbreaktion

β -substituierter Indole.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität

zu Mainz



eingereicht von

Hans - Werner D i b b e r n

geb. in Einsingen Kr. Ulm

Dekan: Prof. Dr. W. Kern

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Rochelmeyer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Albers

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.1961

Herrn Prof. Dr. H. Rochelmeyer möchte ich an dieser Stelle für sein wohlwollendes Entgegenkommen, die Überlassung des interessanten Themas und für eine Reihe wertvoller Anregungen herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. G. Erhart und Herrn Dr. L. Middendorf habe ich sehr zu danken für die Genehmigung, die experimentelle Arbeit im Pharmazeutischen Untersuchungslabor der Farbwerke Hoechst AG durchführen zu dürfen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT	1
PROBLEMSTELLUNG	11
EIGENE UNTERSUCHUNGEN	12
<u>Abgrenzung und Kennzeichnung der van Urk'schen Reaktion</u>	12
Einfluß der Säurekonzentration bei verschiedenen Indolgrundtypen	14
Zur Frage der Einheitlichkeit der van Urk'schen Reaktion	17
<u>Untersuchungen über den Reaktionsverlauf am 3-Methylindol als Modell β-substituierter Indole</u>	19
Die Gelbkomponente	19
Der Verdünnungseffekt (Lösungsmittелеffekt)	20
Die "nicht oxydierende" Farbreaktion	27
Der Oxydationseinfluß	29
Reaktionsschema (phänomenologisch)	37, 38
Präparative Darstellung und Kennzeichnung der Reaktionsprodukte	39
Der violettrote Farbstoff	39
Darstellung	40
Untersuchungen am isolierten Farbstoff	41
Diskussion der Ergebnisse	45
Die Leukoverbindung	46
Darstellung	46
Untersuchungen an der reinen Leukoverbindung	48
Diskussion der Ergebnisse	52
Der blaue Farbstoff	54
Darstellung	54
Kennzeichnung der Eigenschaften	56
Reaktionsschema (Formel)	59

Untersuchungen über die Farbreaktion an anderen β -substituierten Indolen

Die Standardmethoden	60
Prüfung der einzelnen Substanzen	62
Alkylsubstitution	62
Arylsubstitution	63
Funktionelle Gruppen am Pyrrolkern in β -Stellung	64
Funktionelle Gruppen in der β -ständigen Seitenkette	64
Kondensierte Systeme, einschließlich Lysergsäure und Mutterkornalkaloide	67
Anhang: Penniclavin	73

Beurteilung der van Urk'schen Farbreaktion hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für die quantitative Bestimmung der Mutterkornalkaloide

75

ZUSAMMENFASSUNG

79

LITERATURVERZEICHNIS

81

LEBENS LAUF

84

EINLEITUNG UND LITERATURÜBERSICHT

=====

Die erste Veröffentlichung über die Farbreaktion der Mutterkornalkaloide mit einer eisenhaltigen, stark schwefelsauren Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd (im folgenden p-DAB abgekürzt) erfolgte durch van U r k ⁽¹⁾ im Jahre 1929, also zu einem Zeitpunkt, zu dem der chemische Aufbau dieser Alkaloide noch nicht bekannt war. Van U r k kam also von der empirischen Seite her zur Auffindung dieser Reaktion. Einige Jahre später erhielt man einen ersten Hinweis auf die Reaktionsweise, als J a c o b s u. C r a i g ⁽²⁾ in der Kalischmelze der Dihydrolysergsäure (DHLS) neben anderen Spaltprodukten das 3,4-Dimethylindol identifizierten. Schließlich wurde die Lysergsäure endgültig als ein Indolkörper erkannt, der in 3,4-Stellung mit einem Hydrochinolinsystem kondensiert ist.

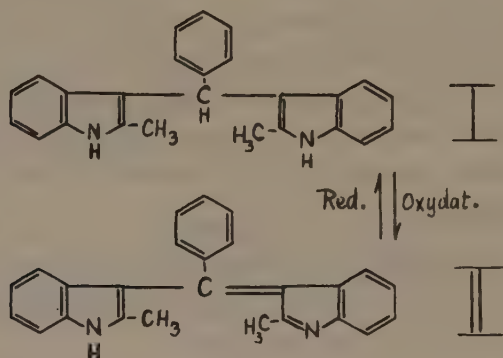
Daß für den Ablauf der van U r k ' schen Farbreaktion der Mutterkornalkaloide tatsächlich allein das Ergolingerüst verantwortlich ist, zeigten T u z s o n, T u z s o n und B a y e r ⁽³⁾.

Nachdem bekannt war, daß es sich bei der Lysergsäure (LS) um ein 3,4-substituiertes Indol handelt, lag es nahe, die van U r k ' sche Reaktion in die große Gruppe der Indol-Aldehyd-Reaktionen einzureihen, um von hier aus ihre Reaktionsweise zu verstehen.

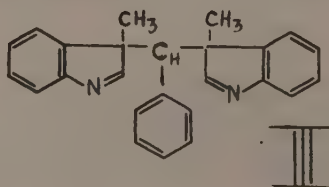
Als klassische Beispiele boten sich hierfür zunächst die Arbeiten Emil F i s c h e r s ⁽⁴⁾ und seiner Schule über die Rosindole an. In diesem Sinne hat P ö h m ⁽⁵⁾ die van U r k ' sche Reaktion in Analogie zu den Arbeiten von W e n z i n g ⁽⁶⁾ gedeutet, ohne allerdings auf die Frage der Kondensationsstelle am Indol und auf die Besonderheiten des p-DAB gegenüber dem Benzaldehyd sowie der Lysergsäure gegenüber dem Skatol einzugehen. Inwieweit ein solcher Analogieschluß unter den veränderten Bedingungen der analytischen Anwendung völlig richtig ist, soll im Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

In den Jahren 1886 - 1887 stellte E. F i s c h e r ⁽⁴⁾ aus α -Methylindol und Benzaldehyd farbige Verbindungen her und klärte die Reaktion als aus zwei Stufen bestehend auf: 1.) 2 Mole α -Methylindol kondensieren mit einem Mol

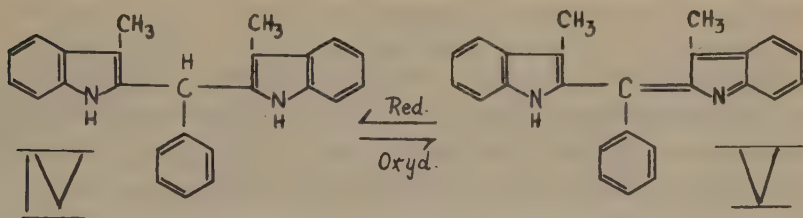
Benzaldehyd unter Wasseraustritt zum Benzyliden-bis- α -Methylindol (oder Phenyl-bis- α -Methylindolyl-methan) (I). 2.) Diese farblose Verbindung (I) kann durch milde Oxydation in einen Farbstoff übergeführt werden, den F i s c h e r "Dimethylrosindol" (II) nannte. Zu demselben Farbstoff gelangte er direkt durch Einwirkung von Benzoylchlorid auf α -Methylindol. Die Formulierung dieser Reaktion wurde nie ernstlich in Frage gestellt, da das H-Atom der β -Stellung des Indols als das aktivste des Moleküls angesehen wird.



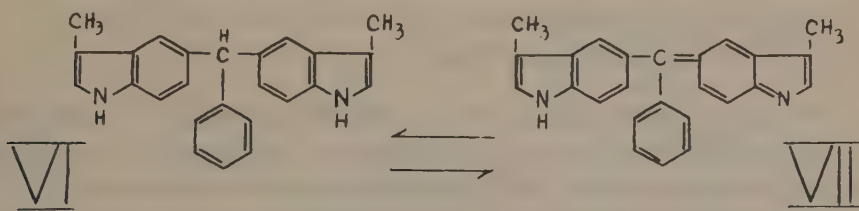
Für die vorliegende Fragestellung der Reaktionsweise der Lysergsäure und der sonstigen biologisch bedeutsamen β -substituierten Indole interessiert aber insbesondere die von W e n z i n g erstmals durchgeführte Kondensation von Benzaldehyd mit Skatol, da letzterem als dem einfachsten β -substituierten Indol eine Bedeutung als Modellsubstanz zukommt. Die Kondensation läuft hier weniger leicht als beim α -Methylindol, nämlich nur unter Zuhilfenahme von Zinkchlorid als Kondensationsmittel ab. Der Verlauf dieser Reaktion wurde im Laufe der Zeit verschieden gedeutet: F r e u n d und L e b a c h ⁽⁷⁾ formulierten hier gleichfalls eine Kondensation in β -Stellung, wobei für den Indolring statt der Imin- die Indoleninschreibweise gewählt wurde (III).



Eine Oxydation zum Farbstoff wird von W e n z i n g nicht beschrieben. Eine solche wäre durch die oben angegebene Formel auch nicht zu erklären. Sie ist aber nach den weiter unten zitierten Autoren tatsächlich möglich, was daher für eine Kondensation in der α -Stellung spricht. Die Umwandlung Leukobase $\rightleftharpoons$ Farbstoff macht danach keine Schwierigkeit (IV, V).



Chigi (8), Dostal (9), Etienne und Heymes (10), v. Dobeneck und Maresch (11) sowie Pöhm (loc. cit.) sprechen sich für diese Formulierung aus; sie ist nach den Substitutionsregeln von Terentjew und Janowska (12) am wahrscheinlichsten (s.u.). Eine andere Auffassung dagegen vertritt Fearon (13): Er formuliert eine Kondensation am Benzolring analog der Malachitgrün-Synthese (VI, VII).



Fearon weist dabei einmal auf die erheblich verschiedenen Tönungen der Farbstoffe aus Indol und α -Methylindol einerseits und aus Skatol andererseits hin; zum andern stützt er seine Annahme auf die Tatsache, daß auch Carbazol- und Carbolinderivate analoge Farbreaktionen mit aromatischen Aldehyden

geben. v. D o b e n e c k und M a r e s c h sind der Ansicht, diese letzteren seien mit denjenigen aus α -freien Indolen nicht vergleichbar, ohne jedoch hierfür experimentelle Belege zu geben.

Gegen die F e a r o n 'sche Auffassung spricht u.a. die Tatsache, daß das 2,3-Dimethylindol die E h r l i c h 'sche Farbreaktion nicht gibt. Entsprechendes gilt für das von D o b e n e c k und M a r e s c h gezeigte negative Verhalten des α, α' -Dimethyl- β, β' -diindolymethans.

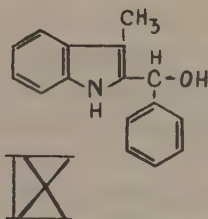
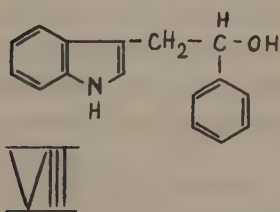
E t i e n n e und H e y m e s machten beim Skatol eine α, α' -Kondensation durch Analogieschlüsse wahrscheinlich. Die Möglichkeit einer Kondensation am Stickstoff glauben sie durch Nachweis des noch verbliebenen aktiven Wasserstoffs mittels Methylmagnesiumjodids ausschließen zu können.

In einer zusammenfassenden Betrachtung über die Substitutionsregelmäßigkeiten der Indole von T e r e n t j e w und J a n o w s k a j a wird auf Grund der Untersuchungen von L o n g e t - H i g g i n s und C o u l s o n ⁽¹⁴⁾ festgestellt, daß sich die größte Ladungsdichte beim Indol zwar in der β -Stellung konzentriert, der Unterschied gegenüber der α -Stellung aber nicht erheblich ist. So wird eine Reihe von Reaktionen an der α -Stellung des Indols mitgeteilt. Die Autoren stellen fest, daß — jedenfalls beim nichtsubstituierten Indol — bisher kein Fall einer Substitution im Benzolkern vor einer solchen im Pyrrolkern festgestellt wurde. Abschließend wird die Ansicht vertreten, das Indolsystem reagiere äußerst empfindlich auf Änderungen der Reaktionsbedingungen, und ein Aufstellen strenger Substitutionsregeln sei nicht möglich.

Bei der Kondensation aromatischer Aldehyde mit Indolen scheint im allgemeinen das Reaktionsverhältnis 1 Mol Aldehyd : 2 Mol Indol deutlich bevorzugt zu sein. Es darf aber nicht unbeachtet bleiben, daß unter Umständen auch Reaktionen im Molverhältnis 1 : 1 eintreten können: F r e u n d und L e b a c h beschreiben solche Kondensationsprodukte aus α -Methylindol + Benzaldehyd. Danach besitzen diese 1:1-Kondensate (im Gegensatz zu den Diindolymethanderivaten) basische Eigenschaft. Sie entstehen vorzugsweise beim Arbeiten in alkoholischer Lösung und unter Anwendung des Molverhältnisses 1:1 oder mit überschüssigem Aldehyd und bilden bei milder Oxydation gleichfalls Farbstoffe. H o s c h e k ⁽¹⁵⁾ erhielt — durch Zusammenschmelzen der Komponenten im Bombenrohr, also unter ganz anderen Arbeitsbedingungen — auch beim

Molverhältnis 1:1 nur bis-Indol-Verbindungen. Möglicherweise gehen die uneinheitlichen und unreproduzierbaren Färbungen, die *Smith* ⁽¹⁶⁾ bei Anwendung der van *Urk*'schen Farbreaktion mit Mutterkornalkaloiden in alkoholischer Lösung erhielt, auf eine teilweise Bildung von 1:1 neben 2:1 Kondensationen zurück. Nach all diesen Befunden zu urteilen, verdient jedenfalls die Frage des Lösungsmittels besondere Aufmerksamkeit.

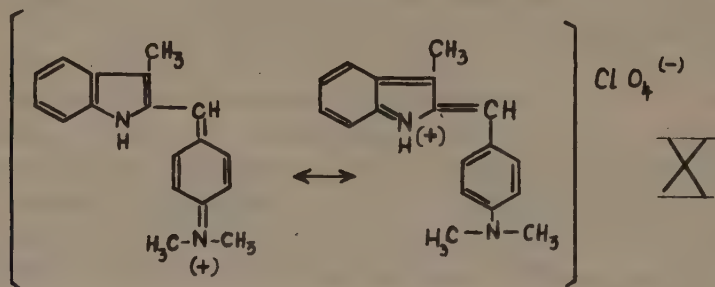
Außer *Freund* und *Lebach* berichtet auch *Hadano* ⁽¹⁷⁾ über 1:1 Kondensate. Er erhielt beim Nacharbeiten der *Wenzing*'schen Vorschrift aus Benzaldehyd + Skatol nicht Benzylidenskatol, sondern eine Verbindung der Formel $C_{16}H_{15}ON$, wofür er ein 3-Phenylhydroxy-aethyl-indol (VIII) vorschlägt. Eine solche Kondensation am Methyl des Skatols ist aber nach *Feist* ⁽¹⁸⁾ wie auch nach neueren Arbeiten (s. z.B. *Fischer* und *Orth* ⁽¹⁹⁾) auszuschließen. Als wahrscheinlicher wäre hier ein Skatyl(α)-phenylcarbinol (IX) anzunehmen.



Auch *Pöhm* ⁽⁵⁾ beschäftigte sich mit der Frage des stöchiometrischen Reaktionsverhältnisses zwischen der Lysergsäure und dem p-DAB bei der van *Urk*'schen Reaktion. Ohne experimentelle Angaben zu machen teilt er mit, daß bei Versuchen mit steigender Menge des Aldehyds schon beim Verhältnis 2 LS : 1 p-DAB eine maximale Farbintensität erreicht werde (Messung mit Filter S 61). *Pöhm* schließt deswegen auf ein solches Reaktionsverhältnis, also auf das Schema der Rosindol-Reaktion nach *E. Fischer*, bzw. *Wenzing* (s.oben).

Schließlich wurde in neuerer Zeit von *Treibs* und *Herrmann* ⁽²⁰⁾ aus Skatol + p-DAB durch Kondensation in alkoholischer Lösung und in

Gegenwart von Perchlorsäure ein in Alkohol violettrot lösliches Farbsalz dargestellt, das die Autoren als [3-Methyl-indolyl(2)] - [p-dimethyl-amino-phenyl] - methen-perchlorat (X) deuten. An Analysendaten wird nur der Stickstoffgehalt angegeben.



Wie aus den obengenannten Befunden der Literatur zu ersehen ist (Wenzing, Freund und Lebach, Hadano, Treibs und Herrmann), spielen sicher die Reaktionsbedingungen eine ausschlaggebende Rolle für den Verlauf der Reaktion. Hierauf haben Terentjew und Janowskaja für Indolreaktionen ganz allgemein hingewiesen. Es bedarf jedenfalls der Nachprüfung, inwieweit es richtig ist, den Ablauf der analytisch gebrauchten Reaktion mit demjenigen präparativer Arbeiten gleichzusetzen.

Beim analytischen Gebrauch der Indol-Aldehyd-Reaktionen liegen in mancherlei Hinsicht besondere Reaktionsbedingungen vor:

Als Reagenz auf Indole wird Benzaldehyd praktisch nicht verwendet. ^{x)} An seine Stelle tritt beim van Urk'schen Reagenz wie auch bei den meisten sonstigen Indol-Reagenzien der p-Dimethylaminobenzaldehyd. (Auf die unterschiedliche Aktivität dieser beiden Aldehyde für Indol-Farbreaktionen wird weiter unten noch eingegangen).

x) Historisch gesehen lassen sich alle derartigen Farbreaktionen wohl auf die Fichtenspanreaktion von Knorr ⁽²¹⁾ zurückführen, für die Erdmann ⁽²²⁾ die aldehydischen Bestandteile des Holzes als eigentliches "Reagenz" erkannte. Ehrlich ⁽²³⁾ führte den p-Dimethylaminobenzaldehyd als besonders empfindliches Reagenz auf Pyrrol- und Indolkörper, vornehmlich für die Diagnostik pathologischer Harnbestandteile, ein. Verschiedene Autoren wie Rohde ⁽²⁴⁾, Steensma ⁽²⁵⁾, Gautier und Hervieux ⁽²⁶⁾, Denigès ⁽²⁷⁾, Blumenthal ⁽²⁸⁾ u.A., sowie in neuerer Zeit Freudweiler ⁽²⁹⁾, Allport und Cocking ⁽³⁰⁾ sowie Neuhoﬀ ⁽³¹⁾ prüften die Brauchbarkeit anderer (meist aromatischer) Aldehyde auf ihre Eignung als Indol-Reagenzien, ohne dabei entscheidende Verbesserungen zu erreichen. (Im Zuge der vorliegenden Arbeit soll daher - unter bewußter Abgrenzung des Themas - nur der p-DAB als Aldehydkomponente herangezogen werden.)

Das stöchiometrische Verhältnis Indolkörper : p-DAB wird beim analytischen Gebrauch der Reaktion zum Nachweis von Indolen stets einen erheblichen Reagenzüberschuß d. h. also Aldehydüberschuß aufweisen.

Lösungsmittel: Die mögliche Beeinflussung des Reaktionsverlaufs durch das Lösungsmittel (Alkohol) wurde schon oben erwähnt. Hierauf wird im experimentellen Teil ausführlich eingegangen werden.

Darüber hinaus sind noch eine Anzahl weiterer Reaktionsbedingungen als wesentliche Faktoren für die Farbbildung erkannt und mehr oder weniger eingehend geprüft worden. Die Mehrzahl solcher in der Literatur mitgeteilten Untersuchungen zielte dabei auf die Festlegung geeigneter Arbeitsmethoden für den praktisch-analytischen Gebrauch hin. Bei der Durchsicht solcher Arbeiten fallen jedoch auch einige Befunde auf, deren eingehendere Beobachtung und Deutung von grundsätzlichem Interesse ist.

Säurekonzentration: Schon in der Arbeit von B l u m e n t h a l (28) fällt auf, daß beim Nachweis des Indols mit p-DAB ein tropfenweiser Zusatz, beim Nachweis des Skatols aber die Zugabe von einigen ml Salzsäure vorgeschrieben wird. F r i e b e r (32) zeigte diesen Unterschied besonders deutlich: Als Reagenz benutzte er eine 5%ige Lösung von p-DAB in einer Mischung von Alkohol-konz. Salzsäure 1:1. Hierbei zeigten die beiden untersuchten Körper ein auffallend unterschiedliches Verhalten: α -Methylindol reagierte sofort kirschrot, Skatol zunächst nicht und erst auf Zusatz von mehr konzentrierter Salzsäure purpurviolett. Diese Beobachtung zeigt folgendes deutlich: Die freie β -Stellung reagiert leichter, d. h. bei niedrigerer Säurekonzentration als die α -Stellung. Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden von F i s c h e r und von W e n z i n g hinsichtlich der größeren Aktivität der β -Stellung. Daß es bei β -substituierten Indolen einer höheren Säurekonzentration bedarf, zeigt ja auch die Tatsache, daß in den van U r k ' schen Reagenzlösungen verschiedener Modifikation eine recht starke, nämlich 50 - 80%ige Schwefelsäure Verwendung findet. V o i g t (33) führte Versuche zur Ermittlung einer optimalen Säurekonzentration bei Mutterkornalkaloiden durch und empfiehlt schließlich einen Schwefelsäuregehalt von ca. 75 Gew. %. (Eigene Untersuchungen hierzu s. im experimentellen Teil.)

Ausschlaggebend für die Farbbildung ist natürlich die Säurekonzentration im Reaktionsgemisch. Diese hängt aber selbstverständlich nicht nur von der Zusammensetzung der Reagenzlösung sondern auch vom Mischungsverhältnis Reagenz : Prüflösung ab, was vielfach nicht oder nicht deutlich genug zum Ausdruck gebracht wird. Hierauf soll besonders hingewiesen werden, da die Säurekonzentration nicht nur die Farbtintensität, sondern auch den qualitativen Ablauf der Reaktion wesentlich mitbestimmt (eigene Versuche).

Oxydationsbedingungen: Eine größere Anzahl von Untersuchungen hat den Zusatz von Oxydationsmitteln bzw. -katalysatoren zum Gegenstand:

Während schon in den präparativen Arbeiten von E. F i s c h e r und von W e n z i n g eine Oxydation als zweite Reaktionsstufe gekennzeichnet worden war, fällt demhingegen auf, daß in älteren Arbeiten über die E h r l i c h ' sche Farbreaktion zunächst nirgends von einer Oxydation im Reaktionsverlauf oder von einem Oxydationsmittel als Bestandteil des Reagenz' die Rede ist. Tatsächlich reagieren Indol und α -Methylindol sehr leicht - in Gegenwart stärkerer Säure aber auch Skatol - mit E h r l i c h ' s Reagenz ohne jeden Zusatz eines Oxydationsmittels.^{x)} Die rotviolette Farbe kommt auch unter strengstem Ausschluß von Sauerstoff, ja selbst in Gegenwart von wenig Sulfit zustande. Die Farbbildung ist aber, jedenfalls beim Skatol, an ganz bestimmte Reaktionsbedingungen gebunden. Danach scheint es hier (unter bestimmten Umständen!) schon in der ersten Stufe zur Bildung einer farbigen Verbindung zu kommen, also nicht zu einer Leukovorstufe, wie in der W e n z i n g ' schen Reaktion beschrieben. Aus Skatol und Benzaldehyd kann dagegen ohne Oxydation keine farbige Verbindung erhalten werden. Hier liegt eine gewisse Lücke im P ö h m ' schen Analogieschluß.

Durch den Zusatz geeigneter Oxydationsmittel zum Säure-Aldehyd-Reagenz, oder auch nach dessen Einwirkung, kann bei β -substituierten, α -freien Indolen eine blaue Färbung erhalten werden. Bei α -substituierten Indolen tritt nach D o b e n e c k und M a r e s c h keine Blaureaktion ein.

x) Hierher gehört auch die umgekehrte Reaktion, nämlich die Verwendung von Skatol-Salzsäure nach M a t t i r o l o ⁽³⁴⁾ als Reagenz auf "Holzstoff", die nach E r d m a n n als eine Skatol-Aldehyd-Reaktion zu deuten ist sowie die kürzlich erschienene Arbeit von A n g e r und F i s c h e r ⁽³⁵⁾ über eine Tüpfelreaktion mit Indol-Salzsäure zum Nachweis von Aldehyden.

Das Entstehen der Blaufärbung durch Oxydation hat, besonders für den Zweck einer kolorimetrischen Bestimmung der Mutterkornalkaloide, noch eine Reihe anderer Autoren beschäftigt: Schon van U r k stellte eine "Beschleunigung und Verschärfung" der Reaktion durch den Zusatz einer Spur Eisen^{III}-Salz fest. M. J. S m i t h ⁽¹⁶⁾ verzichtet auf den Zusatz von FeCl_3 und erzielt die Blaufärbung durch intensive Belichtung. S m i t h stellt fest, daß Oxydationsmittel wie Nitrit, H_2O_2 und Fe^{III} -Ionen die Reaktion stören. A l l p o r t und C o c k i n g benützen ein Reagenz mit Eisenchlorid, schreiben diesem aber eine katalytische, nicht direkt oxydierende Wirkung zu. S c h u l e k und V a s t a g h ⁽³⁶⁾ wiederum sehen FeCl_3 als Oxydationsmittel an. Sie schlagen aber als Oxydans verdünntes Wasserstoffperoxyd vor, dessen Überschuß durch Natriumbisulfit wieder weggenommen wird. Auch in einer in jüngster Zeit erschienenen Arbeit von G y e n e s und B a y e r ⁽³⁷⁾ wird H_2O_2 als Oxydationsmittel angewandt. Die Autoren demonstrieren anhand einer Kurve eine Abnahme der Farbintensität bei steigendem Zusatz an Oxydans, ohne aber dabei optimale Bedingungen zu ermitteln. M o l n a r und U s k e r t ⁽³⁸⁾ setzen Mn^{II} als Oxydationskatalysator zu. Zahlreiche Angaben über die Modifizierungen des Eisengehalts im Reagenz macht V o i g t. Er schreibt dem FeCl_3 gleichfalls die Rolle eines Oxydationsmittels zu und empfiehlt einen Zusatz von 0,15 ml einer 10%igen (g/vol) Lösung von $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ zu 100 ml der schwefelsauren Lösung von p-DAB. Ein solches Reagenz soll maximale Blaufärbungen auch ohne Belichtung ergeben.

Die Notwendigkeit eines oxydierenden Faktors für das Zustandekommen der Blaureaktion einerseits und der ungünstige Einfluß eines Überschusses an Oxydationsmittel andererseits (S m i t h , S c h u l e k und V a s t a g h , G y e n e s und B a y e r) machen diesen Teil der Reaktion zu einem besonderen Problem, das in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht werden soll.

An dieser Stelle soll noch eine Betrachtung über die photometrische Messung der Farbreaktion der Mutterkornalkaloide eingefügt werden. In der Mehrzahl der mitgeteilten Arbeitsvorschriften werden Farbfilter von Stufenphotometern angegeben. Aber selbst bei diesen nicht sehr engen Abgrenzungen des Spektralbereichs besteht keine einheitliche Auffassung über die Lage des Absorptionsmaximums, noch weniger bei genauer Angabe der Wellenlänge

unter Verwendung von Spektralphotometern: Das Amerikanische Arzneibuch USP XIV fordert die Messung "bei einer Wellenlänge zwischen 540 und 560 m μ ", Y a m a g u c h i und Mitarb. (39) wählen 550 m μ , R. G. S m i t h (40) einen Filterschwerpunkt von 550 oder 560 m μ , S i l b e r und S c h u l z e (41) verwenden Zeiss-Filter S 57, V o i g t S 61, P ö h m (42) S 57 und S 61. G j e r s t a d (43) mißt bei 575 m μ , S t r o n g und M a u r i n a (44) bei 590 m μ als dem "ungefähren Mittel der maximalen Absorption". Schließlich fordert P ö h m (45) den Verlauf der gesamten Absorptionskurve von 500 bis 700 m μ aufzunehmen.

Diese außerordentlichen Schwankungen in der Angabe des Absorptionsmaximums werden von P ö h m (42, 45) auf den Zustand der Alkaloide (Dihydro- bzw. Lumiform) zurückgeführt. Da aber auch schon bei einfachen β -substituierten Indolen, wie Skatol, ein relativ breites, unscharfes und je nach den Reaktionsbedingungen stark variierendes Absorptionsmaximum auftritt, kann diese Deutung allein nicht befriedigen. Es muß vielmehr zunächst grundsätzlich geprüft werden, welche Faktoren für die Beeinflussung des Reaktionsverlaufs in Frage kommen und welcher Art ihre Wirkung auf das Absorptionsspektrum der Farbreaktion ist. Über solche Untersuchungen wird im experimentellen Teil der Arbeit berichtet.

PROBLEMSTELLUNG

Aus den im Vorhergehenden mitgeteilten Befunden der Literatur ergeben sich nun eine Reihe von Fragen, die bisher nicht oder nicht ausreichend behandelt worden sind. Ihre experimentelle Bearbeitung ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Wie in der Einleitung kurz erwähnt, soll die van U r k ' sche Reaktion nicht isoliert betrachtet, sondern als ein besonderer Fall von Indol-Aldehyd-Farbreaktionen gesehen und in diesem Sinne untersucht werden. Ihre Besonderheit innerhalb dieser Gruppe basiert hauptsächlich auf zwei Punkten:

1.) In der Ausführungsform unterscheidet sich die van U r k ' sche Reaktion von anderen Variationen vor allem durch die hohe Säurekonzentration des Reaktionsgemisches, sowie in der Mitwirkung von Fe^{III} -Ionen.

2.) Das ursprüngliche Anwendungsgebiet, nämlich Mutterkornalkaloide und Lysergsäure, für welches die Reaktion entwickelt worden ist, stellt einen speziellen Sektor aus der großen Gruppe der Indolkörper dar.

Hieraus ergeben sich zwei hauptsächliche Arbeitsrichtungen, die allerdings nicht streng getrennt, sondern teilweise gemeinsam behandelt werden müssen:

I. Es soll die "klassische" Ausführungsform im Vergleich mit verschiedenen Modifikationen an einer Modellsubstanz geprüft und hierbei insbesondere der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Reaktionsablauf eingehend studiert werden. Als wichtigstes Modell für β -substituierte Indole soll 3-Methylindol (Skatol) Verwendung finden.

II. Es ist zu untersuchen, in welcher Weise Abwandlungen am Indolmolekül die Farbreaktion (verschiedener Ausführungsform) beeinflussen. Schließlich soll aus dem Verhalten des 3-Methylindols und anderer Indole der Reaktionsmechanismus der van U r k ' schen Reaktion geklärt werden, wobei die Reaktionsprodukte der Modellsubstanz präparativ darzustellen und zu kennzeichnen sind.

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

=====

Abgrenzung und Kennzeichnung der van U r k ' schen Reaktion.

(Dieser hier folgende Abschnitt berührt schon die Fragestellungen, die im letzten Teil der Untersuchungen eingehend behandelt werden; er soll aber zur Einführung in die allgemeinen Probleme der vorliegenden Arbeit hier vorangestellt werden.)

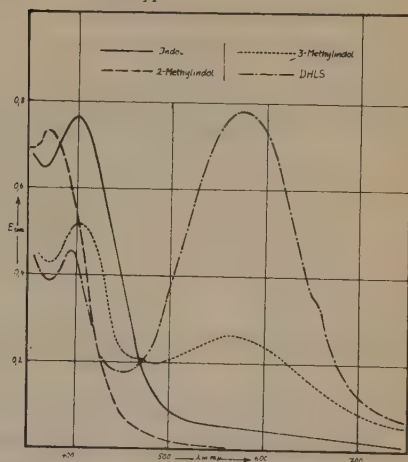
Die van U r k ' sche Reaktion, die im Mittelpunkt der vorliegenden Untersuchungen stehen soll, ist zwar ursprünglich speziell zum Nachweis und zur Bestimmung von Mutterkornalkaloiden entwickelt worden; da aber in der Literatur (z. B. P ö h m ⁽⁵⁾) auch über die Farbreaktion mit einfachen Indolen berichtet wird, und da von solchen einfachen Komponenten am ehesten ein Einblick in die Reaktionsweise zu erwarten ist, erschien es angezeigt, die Ansprechbarkeit der Reaktion zunächst an einigen Indolgrundtypen (vergleichend mit DHLS) zu untersuchen bzw. nachzuprüfen, zumal über die Reaktionsfähigkeit bzw. Reaktionsweise einfacher Indolkörper in der Literatur z. T. widersprechende Befunde festzustellen sind. Dabei wurde zunächst in der üblichen Ausführungsform, d. h. 1 Teil der wässrigen Indollösung + 2 Teile Reagenz, verfahren:

Jeweils $0,25 \cdot 10^{-6}$ Mol der betreffenden Indolverbindung, gelöst in 2,0 ml Wasser oder verdünnt wässrigem Methanol, wurden mit 4,0 ml van U r k ' s Reagenz (in der Zusammensetzung nach V o i g t) vermischt. Nach 15 min. langem Stehen im diffusen Tageslicht bei Zimmertemperatur wurden die Farben beurteilt und die Absorptionsspektren aufgenommen.

Tab.1: Die Ansprechbarkeit des van U r k ' schen Reagenz[®] auf einige Indol-Grundtypen.

	Farbe.	Absorptions- maxima $m\mu$
<chem>c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C</chem> Indolin	0	
<chem>c1ccc2c(c1)c(c[nH]2)C</chem> Indol	gelb *	400
<chem>Cc1c[nH]c2ccccc12</chem> 1-Methylindol	gelb *	397
<chem>Cc1c[nH]c2ccccc12</chem> 2-Methylindol	hellgelb *	377
<chem>Cc1c[nH]c2ccccc12</chem> 1,2-Dimethylindol	hellgelb *	374
<chem>Cc1c[nH]c2ccccc12</chem> 3-Methylindol	grünlich- violett	402, 570
<chem>Cc1c[nH]c2ccccc12</chem> 2,3-Dimethylindol	0	
<chem>OC(=O)C1=CC=C2C(=C1)C(=CN2)C</chem> Dihydrolyserg- säure	intensiv blau	348, 578

Abb.1: van U r k -Farbreaktion einiger Indol-Grundtypen.



Bei der Zugabe des Reagenz[®] zu den wässrigen Lösungen von Indol, 1-Methylindol, 2-Methylindol und 1,2-Dimethylindol wurde vorübergehend eine violettrote Färbung beobachtet, die jedoch nach Zusatz der vollen Reagenzmenge und nach Durchmischen nach Gelb umschlug.

Aus Tabelle 1 und Abb. 1 lassen sich einige - z. T. schon bekannte - Befunde ablesen und wie folgt zusammenfassen:

- 1) Indoline, sowie in 2- und 3-Stellung substituierte Indole, geben keine Farb-reaktion mit dem van U r k ' schen Reagenz.
- 2) Eine van U r k ' sche Reaktion im eigentlichen Sinne, d. h. mit einer Absorption im Bereich 570 - 620 $m\mu$, geben nur solche Indole mit freier 2-Stellung, die zugleich in 3-Stellung einen Substituenten tragen.
- 3) Unter diesen zeichnet sich die DHLS gegenüber dem 3-Methylindol durch eine besonders intensive Blaufärbung aus. Die Art der Substitution in der β -Stellung hat demnach einen erheblichen Einfluß auf die Ausbildung der Farbreaktion. Dieser Faktor soll im letzten Teil der Arbeit eingehend geprüft werden.

- 4 Indol und 2-Methylindol geben mit dem van U r k ' schen Reagenz in der üblichen Ausführungsform nur eine Gelbfärbung. Dies soll im folgenden Abschnitt näher untersucht werden.
- 5 Substitution in 1-Stellung hat, abgesehen von einer geringfügigen hypsochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums, keinen prinzipiellen Einfluß auf die Reaktion. 1-Methylindol verhält sich praktisch wie Indol. Die Angaben von A n g e r und F i s c h e r (35), 1-Methylindol reagiere nicht mit Aldehyden, ist demnach einzuschränken.

Einfluß der Säurekonzentration auf die Farbreaktion bei verschiedenen Indoltypen.

Auffällig an den oben genannten Befunden war zunächst das Verhalten des Indols und des 2-Methylindols: Beide geben mit van U r k ' s Reagenz lediglich eine Gelbfärbung, wohingegen in zahlreichen älteren Arbeiten (23, 24, 25, 27, 28, 29) für diese Körper rote, bzw. violettrote Farbreaktionen mit p-DAB oder anderen aromatischen Aldehyden beschrieben worden sind. Die Erklärung für dieses abweichende Verhalten konnte nur in der besonderen Ausführungsform der van U r k ' schen Reaktion gesucht werden: In erster Linie war dabei an die hohe Säurekonzentration zu denken. (Vergleiche hierzu die Fußnote zu Tab. 1).

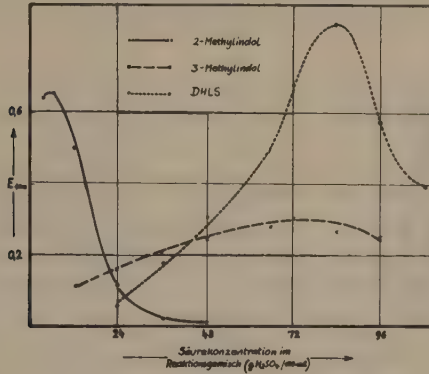
Wie in der Einleitung erwähnt, wurde in der Literatur auf die Notwendigkeit eines höheren Säurezusatzen bei Skatol — gegenüber dem 2-Methylindol — verschiedentlich hingewiesen; auch ist der Einfluß der Säurekonzentration bei der Bestimmung der Mutterkornalkaloide durch verschiedene Autoren, besonders durch V o i g t (33), geprüft worden, doch liegen bisher keine eingehenderen Untersuchungen über die Bereitschaft verschieden substituierter Indolkörper zur Bildung der Farbreaktion mit p-DAB in Abhängigkeit von der Säurekonzentration vor. Diese Frage sollte deshalb zur Klärung der oben genannten Befunde (2) und (4) hier behandelt werden. Als Typen wurden für diese Fragestellung 2-Methylindol, 3-Methylindol und DHLs ausgewählt.

Jeweils 0,5 ml einer 10^{-3} molaren Lösung der genannten Verbindungen wurden mit 8,5 ml eines Wasser-Schwefelsäure-Gemischs zunehmender Konzentration und hierauf mit 1,0 ml des van U r k ' schen Reagenz' (Zusammensetzung nach Voigt) versetzt. Den Mischungen Nr. 1 und 2 wurde — zur Erzielung einer noch niedrigeren Säurekonzentration — 1,0 ml einer Reagenzlösung mit gleichem p-DAB = und Eisen= aber 1/2 bzw. 1/4

Säuregehalt zugesetzt. Nach 15 min. langem Stehen im diffusen Tageslicht bei Zimmertemperatur wurden die Absorptionsspektren aufgenommen.

Tabelle 2 und Abb. 2 geben die Abhängigkeit der maximalen Farbentwicklung von der Säurekonzentration wieder. Die Abb. 3, 4 und 5 zeigen die Änderung der Absorptionsspektren, d.h. auch die qualitativen Farbänderungen unter dem Einfluß zunehmender Säurekonzentration.

Abb. 2: Ausbildung der van U r k - Farbreaktion in Abhängigkeit von der Säurekonzentration.



Tab. 2: Ausbildung der van U r k ' schen Farbreaktion in Abhängigkeit von der Säurekonzentration im Reaktionsgemisch.

Nr.	Säurekonzentration im Reaktionsgemisch	2-Methylindol $E_{1\text{ cm } 537\text{ m}\mu}$	3-Methylindol $E_{1\text{ cm } 570\text{ m}\mu}$	Dihydrolyserg- säure $E_{1\text{ cm } 578\text{ m}\mu}$
1	3 g H ₂ SO ₄ / 100 ml	0,647		
2	6 " "	0,662		
3	12 " "	0,500	0,114	
4	24 " "	0,118	0,160	0,056
5	36 " "	0,023	0,203	0,179
6	48 " "	0,014	0,249	0,313
7	66 " "	0,012	0,279	0,491
8	72 " "	0,010	0,306	0,680
9	84 " "		0,258	0,850
10	96 " "	0,008	0,251	0,570
11	108 " "			0,398

Abb. 3: Absorptionsspektren der van U r k -Reaktion mit 2-Methylindol bei verschiedenen Säurekonzentrationen.

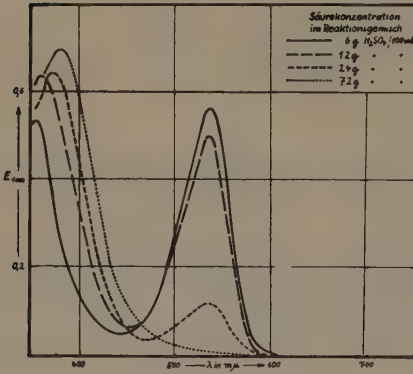


Abb. 4: Absorptionsspektren der van U r k -Reaktion mit 3-Methylindol bei verschiedenen Säurekonzentrationen.

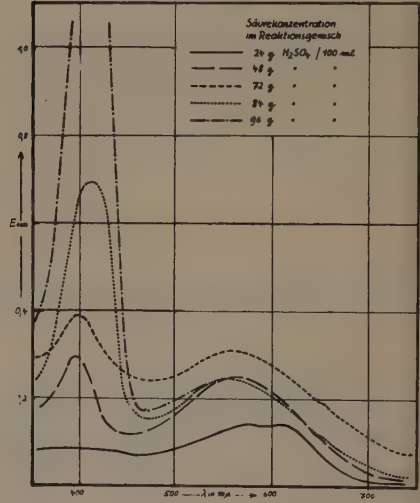
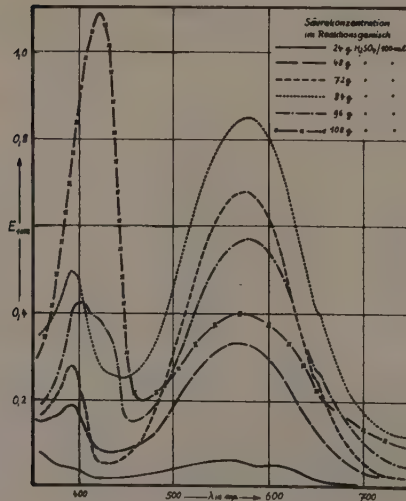


Abb. 5: Absorptionsspektren der van U r k -Reaktion mit DHLs bei verschiedenen Säurekonzentrationen.



Aus Tabelle 2 und den Abbildungen 2 - 5 ergeben sich die folgenden Befunde:

- 6 Die 3 geprüften Typen zeigen in der Ausbildung der Farbreaktion eine ausgeprägte, untereinander stark unterschiedliche Abhängigkeit von der Säurekonzentration. Die Gestalt der so erhaltenen Abhängigkeitskurven ist für die geprüften Typen charakteristisch: 2-Methylindol erfordert eine niedrige, die beiden β -substituierten Indole eine relativ hohe Säurekonzentration für die maximale Farbentwicklung.

Zur Frage der Einheitlichkeit der van U r k ' schen Reaktion.

Außer der oben genannten Abhängigkeit einer maximalen Blau- oder Violett-färbung von der Säurekonzentration ergibt sich aus den Abbildungen 3, 4 und 5 noch ein wesentlicher Nebebefund:

- 7 Bei allen drei Typen tritt mit steigender Säurekonzentration zunehmend eine Gelbkomponente im Absorptionsspektrum auf. Bei den beiden β -substituierten Indolkörpern erfolgt der Aufbau einer neuen Bande im Bereich um etwa 410 m μ , die mit steigender Säurekonzentration stark an Intensität zunimmt. Von einer gewissen Säurekonzentration an "konkurriert" diese Gelbkomponente mit der eigentlichen (violett-blauen) Färbung, d. h. eine Erhöhung der Absorption bei etwa 410 m μ geht schließlich mit einem Abbau der Blauviolett-färbung parallel.

Dieser Befund ließ die Frage aufkommen, ob es sich bei der van U r k - Farb-reaktion mit β -substituierten Indolen — besonders bei höherer Säurekonzentration — um eine einheitliche Reaktion handle.

Im Hinblick auf die bekannte K e l l e r ' sche Reaktion lag der Verdacht nahe, daß hier vielleicht eine Farbbildung mit Eisen-Schwefelsäure ohne Beteiligung des Aldehyds als eine Nebenreaktion ablaufen könnte. Um dies zu untersuchen wurden — zunächst wieder an einigen Indol-Grundtypen -- Versuche mit folgenden Reagenzien durchgeführt:

A mit Fe-haltiger 65 vol%iger Schwefelsäure (ohne p-DAB).

B mit einer 0,2%igen Lösung von p-DAB in 10 vol%iger Schwefelsäure (ohne Fe^{III}).

C mit van U r k ' schem Reagenz wie oben, jedoch ohne Fe^{III} .

D mit 65 vol%iger Schwefelsäure ohne Fe^{III} und ohne p-DAB.

E mit dem vollen van U r k ' schen Reagenz (als Vergleich).

Jeweils 0,5 ml der 10^{-3} molaren Lösungen wurden mit 1,5 ml Wasser und mit 4 ml der genannten Reagenzlösungen versetzt. Nach dem Durchmischen und 10 min. langem Stehen im diffusen Tageslicht bei Zimmertemperatur wurden die Färbungen beurteilt und die Absorptionsspektren aufgenommen.

Tab. 3: Die Beteiligung des Eisens an der van U r k ' schen Reaktion.

	A	B	C	D	E
Indol	0	violett-rot	gelb	0	gelb
2-Methyl-indol	0	rot	hellgelb	0	hellgelb
3-Methyl-indol	gelb	schw. violett	olivgrün	sehr schw. gelb	grünblau
DHLS	rötlich-violett	0	schwach blauviol.	sehr schw. rosaviolett	intens. blau

Abb. 6: Beteiligung des Eisens an der Reaktion (3-Methylindol).

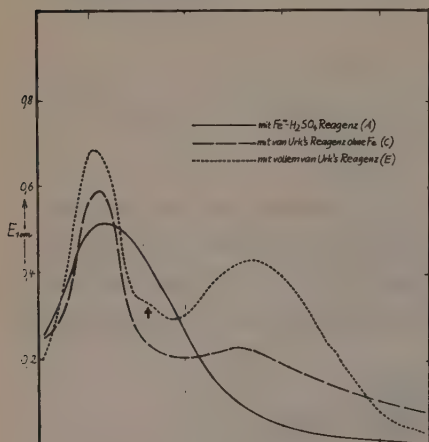
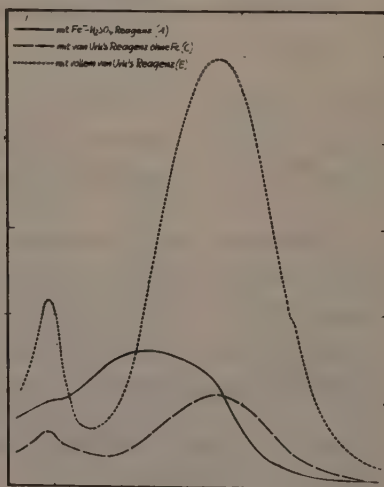


Abb. 7: Beteiligung des Eisens an der Reaktion (DHLS)



Aus Tab.3 und den Abb.6 und 7 lassen sich folgende Befunde ablesen:

- 8) Alle geprüften Indole der Tab.3 reagieren auch mit eisenfreien p-DAB-Reagenzien unter Farbbildung: Indol und 2-Methylindol in schwach saurer Lösung (B) violettrot bzw. rot, bei hoher Säurekonzentration (C) gelb, also nahezu gleich wie mit den eisenhaltigen Reagenzien. 3-Methylindol gibt bei der niedrigen Säurekonzentration eine schwache Violett-, bei hoher Säurekonzentration eine olivgrüne Färbung. DHLS reagiert nur bei höherer Säurekonzentration (C), ohne Eisen aber ganz erheblich schwächer als mit dem vollen van U r k - Reagenz (E).
- 9) Unter den geprüften Typen reagieren die beiden Verbindungen mit freier α -, aber besetzter β -Stellung in geringerem Maße auch mit eisenhaltiger 65 vol%iger Schwefelsäure ohne Aldehyd (A). Auch bei dieser Reaktion hat die Art des Substituenten in β -Stellung einen Einfluß auf die entstehende Färbung. Den Absorptionsspektren nach zu urteilen ist diese "Eisen-Schwefelsäure-Reaktion" in der vollen van U r k - Reaktion bei der DHLS nicht, beim 3-Methylindol nur in geringem Maße beteiligt (Erhöhung der Absorption bei $\lambda = 470 \text{ m}\mu$, Abb.6, Pfeil).
- 10) Die "Gelbkomponente" in der van U r k - Reaktion der β -substituierten Indole wird durch Fe^{III} zwar etwas verstärkt, tritt aber bei hoher Säurekonzentration auch mit dem eisenfreien Reagenz (C) auf. Hierauf soll im folgenden näher eingegangen werden.

Untersuchungen über den Reaktionsverlauf am 3-Methylindol als Modell β -substituierter Indole.

Die Gelbkomponente.

Während bei der Lysergsäure, Dihydrolysergsäure und ihren Derivaten die übliche Ausführungsform der van U r k - Reaktion (d.h. mit einer Säurekonzentration im Reaktionsgemisch von etwa 43 vol% = 79 g/100 ml) eine intensive, fast reine Blaufärbung mit einem stark ausgebildeten Absorptionsmaximum liefert (Abb. 1, 5), ist dies, wie oben beschrieben, beim 3-Methylindol als dem einfachsten Typ dieser Verbindungsklasse nicht in

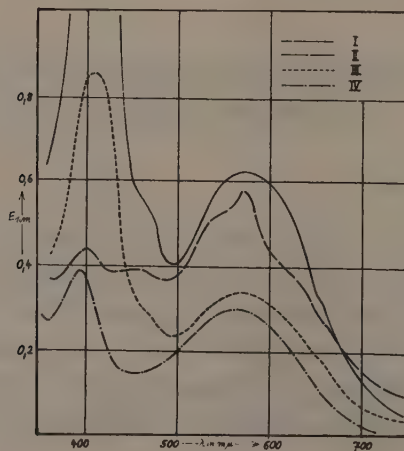
gleicher Weise der Fall. Die in Abb. 4 wiedergegebenen spektralphotometrischen Befunde demonstrieren die hierbei auftretende Schwierigkeit sehr deutlich: Einerseits benötigt die Reaktion für eine maximale Entwicklung der blauvioletten Farbe eine relativ hohe Säurekonzentration. Andererseits tritt bei der für die Blauviolett-färbung optimalen Säurekonzentration schon in sehr erheblichem Maße die oben genannte "Gelbkomponente" auf. Diese Verbreiterung des Absorptionsspektrums, die vom Auge als unreine Mischfarbe empfunden wird, bringt den Verdacht auf, daß es sich hierbei um eine uneinheitliche Reaktion handelt.

Der Verdünnungseffekt.

Es wurde nun versucht einen Ausweg aus diesem Problem darin zu finden, daß die Reaktion zunächst in hoher Säurekonzentration angesetzt, danach aber mit Wasser verdünnt wurde. Hierzu wurden die folgenden vergleichenden Versuche durchgeführt:

- I. 0,5 ml einer 10^{-3} molaren Lösung von 3-Methylindol + 0,5 ml Wasser wurden mit 2,0 ml van U r k ' s Reagenz versetzt.
- II. Wie I, jedoch nach 10 min. langem Stehen mit 3,0 ml Wasser verdünnt.
- III. Wie II, jedoch anstelle des Wassers mit 3,0 ml einer 43 vol%igen Schwefelsäure verdünnt.
- IV. 0,5 ml der 10^{-3} molaren Lösung + 3,5 ml Wasser + 2,0 ml van U r k ' s Reagenz.

Abb. 8: Grundversuche zum Verdünnungseffekt



Aus Abb. 8 lassen sich folgende Befunde ablesen:

- 11 Bei 3-Methylindol erhält man durch nachträgliches Verdünnen der üblichen van U r k - Reaktion mit Wasser (II) eine Farbänderung: Die Gelbkomponente geht stark zurück, und es tritt eine Violettfärbung auf.
- 12 Die Maximaextinktion im Wellenbereich um $570 \text{ m}\mu$ ist trotz der Verdünnung nur wenig niedriger als bei der unverdünnten Reaktion (I). Sie ist erheblich stärker als bei einer mit 43 vol%iger Schwefelsäure verdünnten (III), oder in verdünnter Lösung durchgeführten Reaktion (IV).

Es lassen sich demnach in der genannten Arbeitsweise die Vorzüge der höheren Säurekonzentration (nämlich vollständigere Reaktion) mit denjenigen der verdünnteren Lösung ("reineres" Absorptionsspektrum und höhere relative Extinktion) vereinigen.

Dieser sowohl praktisch als auch theoretisch interessante Effekt wurde im folgenden näher untersucht: Da bei Aufrechterhaltung der Säurekonzentration durch Verdünnen mit 43 vol%iger Schwefelsäure (III) die Farbreaktion in qualitativer und auch relativ quantitativer Hinsicht nicht verändert wurde, wohl aber durch Verdünnen mit Wasser (II), lag die Annahme nahe, daß die Säurekonzentration und besonders die Dissoziation im Endgemisch einen Einfluß auf die Ausbildung der Farbe haben könnten. Nach dieser Annahme mußte durch Verwendung organischer Lösungsmittel gleichfalls eine, vielleicht noch stärkere Beeinflussung möglich sein. Es wurden daher mit einer Reihe wassermischbarer Lösungsmittel (anstelle des Wassers) entsprechende Verdünnungsversuche durchgeführt:

10.0 ml einer 10^{-3} molaren Lösung von 3-Methylindol + 10,0 ml Wasser wurden unter leichter Kühlung mit 40 ml van U r k ' s Reagenz versetzt (=RM). Nach 15 min. langem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Mischung eiskühlt, um etwaige weitere Veränderungen während der folgenden Ansätze zu verhindern. Von dieser Mischung wurden jeweils Anteile von 5.0 ml entnommen und mit 5.0 ml des betreffenden Lösungsmittels gemischt. Nach 1 min. langem Stehen wurden von den so erhaltenen Ansätzen die Absorptionsspektren aufgenommen.

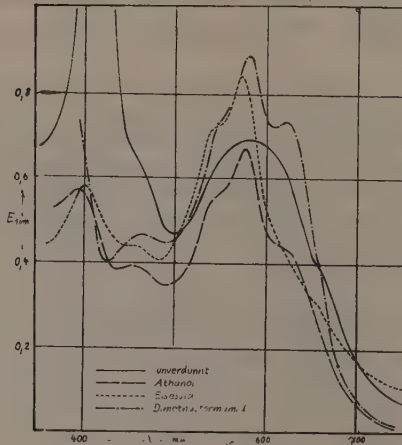
Tab. 4 gibt die Lage der Absorptionsmaxima und die dort ermittelten Extinktionen wieder, Abb. 9 zeigt eine Auswahl der erhaltenen Absorptionsspektren.

Tab. 4: Der Lösungsmittelleffekt.

Verdünnungsmittel	Farbe	Absorptionsmaxima (m μ)				Extinktion E _{1 cm} in den Absorptionsmaxima			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
unverdünnt	grün	<u>406</u>		576		1,27		0,68	
43 vol%ige H ₂ SO ₄	grün	<u>408</u>		576		0,65		0,34	
Wasser	viol.-blau	405		<u>573</u>		0,39		0,52	
Methanol	blau	404		<u>576</u>	(616)	0,43		0,52	0,44
Aethanol	viol.-blau	400		<u>576</u>		0,56		0,66	
Aceton	blau- violett	403	(542)	<u>575</u>		0,54		0,87	
Dimethylformamid	blau			<u>576</u>	616			0,88	0,73
Eisessig	blau- violett	405	(542)	<u>576</u>		0,57		0,83	

Die unterstrichenen Zahlen bedeuten das Hauptmaximum, die in Klammer stehenden schwach ausgeprägte Maxima ("Schultern").

Abb. 9: Lösungsmittelleffekt

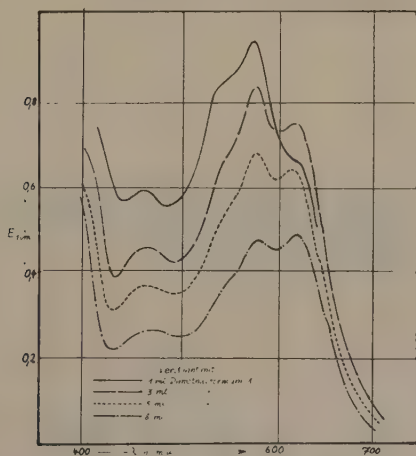


Beim langsamen Zusetzen des Verdünnungsmittels in den oben genannten Versuchen war aufgefallen, daß die hierbei entstehende Farbtönung u.U. auch von der Menge des zugesetzten Lösungsmittels beeinflusst werden kann. Beim Dimethylformamid war dieser Effekt besonders stark ausgeprägt und wurde hier an Hand der Absorptionsspektren näher untersucht:

Jeweils 3,0 ml der oben genannten Reaktionsmischung "RM" wurden mit 1, 3, 5 und 8 ml Dimethylformamid verdünnt und die Absorptionskurven der so erhaltenen Mischungen aufgenommen.

Die Gemische zeigten deutliche Farbnuancierungen von violett nach blau. Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsschwergewichts mit steigendem Zusatz von Dimethylformamid kommt in den Spektren deutlich zum Ausdruck (Abb.10).

Abb.10: Änderung des Absorptionsspektrums bei steigendem Zusatz von Lösungsmittel



Die stark farbtintensivierende Wirksamkeit der organischen Lösungsmittel bei diesem Verdünnungseffekt legte erneut die Frage nach einer Deutung dieser Beobachtung auf. Neben der Erniedrigung der Säurekonzentration – entsprechend der volumenmäßigen Verdünnung – war, wie oben angedeutet, besonders auch der Änderung der Dissoziation Aufmerksamkeit zu schenken. Um diese zahlenmäßig vergleichend zu erfassen, wurde die elektrische Leitfähigkeit einer Anzahl von Gemischen gemessen, und diese Befunde den Meßwerten der Extinktion gegenübergestellt.

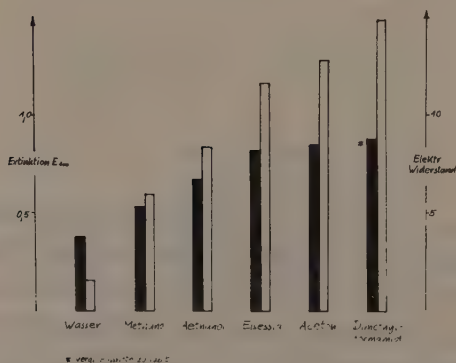
Von Verdünnungen aus je 5,0 ml der oben genannten Reaktionsmischung "RM" mit geeigneten Mengen (meist 5 ml) verschiedener Verdünnungsmittel wurde die Absorption $E_{1\text{ cm}}$ bei $\lambda = 576\text{ m}\mu$ sowie die elektrische Leitfähigkeit gemessen. Der Zusatz des Verdünnungsmittels erfolgte langsam und unter sorgfältigem Abführen der entstehenden Wärmetönung.

Zur Messung der relativ sehr hohen Leitfähigkeitswerte wurde eine Meßzelle mit 2 kleinen platinieren Platinelektroden und relativ großem Elektrodenabstand hergestellt. Die Zelle wurde mit einer 0,1 molaren KCl-Lösung geeicht (Zellkonstante $K = 25,5$). Die Messung selbst erfolgte mit einem Leitfähigkeitsmesser WTW Typ LBR mit Wechselstrom von 3 kHz.

In Tabelle 5 sind die so erhaltenen Meßergebnisse zusammengestellt. Die "relative Extinktion" ist bei denjenigen Gemischen mit größerem oder kleinerem Endvolumen als 10 ml gleichfalls auf 10 ml umgerechnet.

Abb. 11 zeigt die vergleichende Darstellung von Extinktion und elektr. Widerstand bei mengenmäßig gleichen Verdünnungen (also bei gleicher Säurekonzentration) mit verschiedenen Lösungsmitteln.

Abb. 11: Verdünnungseffekt mit verschiedenen Lösungsmitteln/
Extinktion und elektrischer Widerstand des Gemisches
bei gleicher Säurekonzentration



Tab. 5: Zusammenhang zwischen Säurekonzentration, elektrischer Leitfähigkeit und relativer Extinktion.

Zusammensetzung des Gemisches: jeweils 5,0 ml RM	Säurekonzentr. K g H ₂ SO ₄ / 100 ml		Relative Extinktion	El. Leitfähigkeit δ bzw. El. Widerstand	
	K	1/K		δ	1/ δ
unverdünnt	79		0,34	0,42	2,4
+ 5 ml 43 vol%ige H ₂ SO ₄	79		0,34	0,42	
+ 5 ml Wasser	39,5		0,38	0,74	1,5
+ 5 ml 10%iges NH ₃	25,6		0,44	0,59	
+ 5 ml 25%iges NH ₃	5,0		0,57	0,36	
+ 5 ml Methanol	39,5		0,53	0,17	5,9
+ 5 ml Aethanol	39,5		0,66	0,12	8,3
+ 5 ml Eisessig	39,5		0,81	0,087	11,5
+ 5 ml Dimethyl- formamid	39,5		0,87 ^x	0,067	14,9
+ 5 ml Aceton	39,5		0,83	0,079	12,7
+ 2,5 ml Aceton	52,9	0,0189	0,53	0,145	6,9
+ 5,0 ml Aceton	39,5	0,0253	0,83	0,079	12,7
+ 7,5 ml Aceton	31,7	0,0316	0,93	0,049	20,4
+ 10 ml Aceton	26,3	0,0381	0,99	0,036	27,8

Die zusammenfassende Auswertung der in den Abb. 9, 10 und 11 sowie in den Tabellen 4 und 5 wiedergegebenen Versuchsergebnisse ergibt die folgenden Feststellungen:

- (13) Der oben genannte Effekt einer relativen Farbintensivierung durch nachträgliches Verdünnen der van U r k ' schen Reaktion (vergl. (12)) wird durch Verwendung von Ammoniak oder von organischen Lösungsmitteln anstelle des Wassers erheblich verstärkt.

x) Wie aus Abb. 10 ersichtlich, kommt es beim Verdünnen mit Dimethylformamid zu einer Verbreiterung der Absorption nach dem Langwelligen hin, bzw. es tritt eine neue Absorptionsbande bei etwa 620 m μ auf. Aus diesem Grunde ergibt die Auswertung der Farbintensität durch Messung bei 576 m μ hier relativ zu niedrige Werte.

Für das Zustandekommen und die Größe dieses Effekts ist der Einfluß von zwei Faktoren erkenntlich: Die Verminderung der Säurekonzentration und die Abnahme des Dissoziationsgrades in der Mischung. Beide Faktoren wirken gleichsinnig und überlagern sich gegenseitig. Beim Verdünnen mit Wasser wird die Konzentration der Schwefelsäure zwar auf die Hälfte vermindert, die Dissoziation aber noch erhöht. Die Zunahme der relativen Extinktion ist daher nur mäßig. Auch beim Verdünnen mit 10%igem Ammoniak wird die Dissoziation gegenüber der unverdünnten Lösung noch erhöht, die Konzentration an Schwefelsäure wird aber stärker erniedrigt als beim Wasserzusatz, so daß eine merkliche relative Farbverstärkung resultiert. Beim 25%igen Ammoniak fällt die Abnahme der freien Säure so stark ins Gewicht, daß es hierdurch auch zum Rückgang der Leitfähigkeit kommt.

Beim Verdünnen mit organischen Lösungsmitteln wird sowohl die Konzentration der Säure als auch ihre Dissoziation — und zwar letztere ganz erheblich — zurückgedrängt. Hier ist die Zunahme der relativen Extinktion besonders groß.

Bei gleicher Säurekonzentration hängt die Farbintensität vornehmlich von der Dissoziation der Säure in der Mischung ab. Diese wird durch das angewandte Lösungsmittel bestimmt (Abb. 11).

- 14 Nicht nur die Höhe der maximalen Absorption wird durch das nachfolgende Verdünnen mit Lösungsmitteln beeinflusst; auch die Gestalt der Spektren wird deutlich verändert: Die Absorptionskurve, die bei der unverdünnten van U r k - Reaktion des 3-Methylindols gerade im violetten bis blauen Bereich breit und wenig ausgeprägt ist, erfährt durch das Verdünnen mit Lösungsmitteln eine deutliche Differenzierung, die auch von der Art und Menge des Lösungsmittels bestimmt wird.

Allen dieserart erhaltenen Spektren (durch Verdünnen der van U r k - Reaktion) ist ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 576 \text{ m}\mu$ gemeinsam. Seine Zuordnung sowie auch diejenige der beiden anderen (z. T. nur angedeuteten) Absorptionsbanden um $542 \text{ m}\mu$ und bei etwa $620 \text{ m}\mu$ bedürfen weiterer Untersuchungen.

Die oben genannte stärkere Differenzierung des Spektrums durch den Verdünnungseffekt ergab damit eine wesentlich verbesserte Möglichkeit zur Beobachtung

verschiedener Einflüsse auf den Reaktionsverlauf. Zunächst schien es wesentlich, den Einfluß der Oxydation auf die Ausbildung des Spektrums zu untersuchen.

Die "nicht oxydierende Farbreaktion".

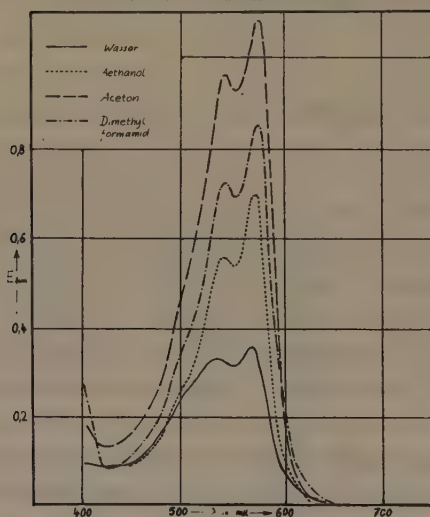
Wie eingangs in der Literaturübersicht erwähnt (s. S. 8), gibt p-DAB unter geeigneten Bedingungen, besonders bei günstiger Säurekonzentration, mit Skatol und anderen β -substituierten Indolen ohne alle oxydierenden Einflüsse eine violettrote Färbung. Besonders gut entwickelt sich diese Farbe bei Verwendung der in der älteren Literatur üblichen alkoholischen (salzsauren) Lösung des Aldehyds. Danach konnte erwartet werden, daß auch die oben mitgeteilte Arbeitstechnik, also Kondensation in stark saurer Lösung und nachfolgendes Verdünnen mit Lösungsmitteln, bei Ausschluß von Oxydationseinflüssen eine Farbreaktion erbringen würde. Es wurde daher diese "nichtoxydierende Farbreaktion" unter Anwendung der oben genannten Verdünnungstechnik näher untersucht:

Jeweils 1,0 ml einer $0,3 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung von 3-Methylindol (=L) wurde mit 2 ml einer Reagenzlösung versetzt, die entsprechend dem bisher verwendeten van U r k - Reagenz zusammengesetzt war, jedoch kein FeCl_3 , sondern eine Spur Natriumpyrosulfit enthielt (=n.o.R. = nicht oxydierendes Reagenz). 2 min. nach der Reagenzzugabe wurde mit den entsprechenden Lösungsmitteln (jeweils 3,0 ml) unter Abführen der entstehenden Verdünnungswärme gemischt.

Hierbei entstand zunächst, d.h. nach Zusatz des Reagenz^x eine kräftige Gelbfärbung und nach Zusatz des Verdünnungsmittels in allen Fällen eine gleichartige, reine, violettstichig-rote Färbung. Die Intensität der Farbe zeigte aber erhebliche Unterschiede bei Anwendung der verschiedenen Lösungsmittel (Abb. 12). ^{x)}

^{x)} Hinsichtlich der Stabilität dieser Färbungen zeigte sich die Verdünnung mit Dimethylformamid allen anderen Mischungen weit überlegen.

Abb. 12: Verdünnungseffekt bei der nichtoxydierenden
Farbreaktion 3-Methylindol - p-DAB.



Die Gestalt der so erhaltenen Spektren forderte nun zum Vergleich mit den früher erhaltenen Absorptionskurven der Abb. 9 und 10 — also mit solchen unter Anwendung des vollen van U r k ' schen Reagens — auf. Hierbei ergeben sich die folgenden Feststellungen:

- 15 Durch Verdünnen der "nichtoxydierenden Reaktion" mit Lösungsmitteln erhält man aus der in stark saurer Lösung gelben Komponente eine intensiv violettrote Form mit einer scharf ausgeprägten Absorptionsbande im Bereich 500 - 600 mμ. Das Absorptionsmaximum stimmt mit demjenigen der verdünnten, vollen van U r k - Reaktion überein (um 575 mμ). Die nichtoxydierende (und nachfolgend verdünnte) Reaktion zeigt noch ein kleines, aber deutliches Maximum bei $\lambda = 541 \text{ m}\mu$, das bei der vollen (verdünnten) van U r k - Reaktion nur als Schulter angedeutet ist. Sie besitzt aber — im Gegensatz zur Verdünnung der vollen van U r k - Reaktion (also mit Fe^{III}) — praktisch keine Absorption im Bereich $\lambda < 610 \text{ m}\mu$.

Das Absorptionsspektrum ist bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel qualitativ gleich, die Höhe der Absorption dagegen stark von diesen anhängig.

Der Oxydationseinfluß.

Nach dem oben Gesagten schien es nun wichtig, die Unterschiede der nichtoxydierenden Reaktion gegenüber solchen mit verschiedenen Oxydationseinflüssen an Hand der Absorptionsspektren näher zu untersuchen. Auch hier wurden wiederum die Vorzüge der Verdünnungstechnik ausgenutzt.

Jeweils 1,0 ml der Lösung L (s.o.) wurde in folgender Weise zur Reaktion gebracht:

A: 1,0 ml L + 2,0 ml n.o.R. + 3,0 ml Dimethylformamid (=DMF)

B: 1,0 ml L + 2,0 ml volles van U r k - Reagenz + 3,0 ml DMF

C: 1,0 ml L + 2,0 ml n.o.R. + 3,0 ml DMF + 1 Tropfen einer 0,5%igen NaNO_2 -Lösung

D: 1,0 ml L + 2,0 ml n.o.R. + 1 Tropfen der oben gen. NaNO_2 -Lösung + 3,0 ml DMF.

Die Zugabe des Verdünnungsmittels erfolgte jeweils 2 min. nach Zumischen der Reagenzlösung unter Abführen der Verdünnungswärme. Die Aufnahme der Spektren erfolgte 5 min. nach Zumischen des letzten Bestandteils (Zimmertemperatur).

Die so erhaltenen Absorptionsspektren zeigt Abb.13. Bei Parallelversuchen mit Aceton als Verdünnungsmittel führte der Zusatz von Nitrit zu einem sehr raschen Verblässen der Farbe. Aus diesem Grunde wurde speziell für diese stark oxydierende Reaktionsweise die Bedeutung des Lösungsmittels besonders geprüft. Die Versuchsbedingungen entsprachen den oben unter C genannten, wobei lediglich das Lösungsmittel variiert wurde.

Abb.13: Die oxydative Veränderung der Farbreaktion.

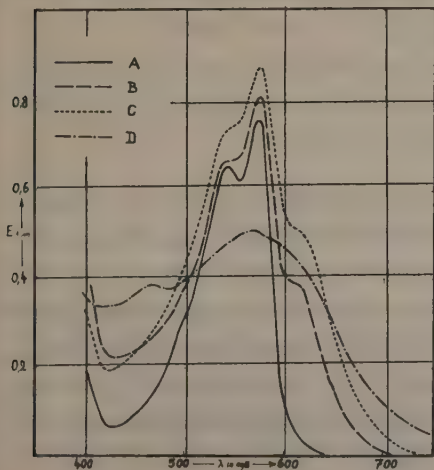
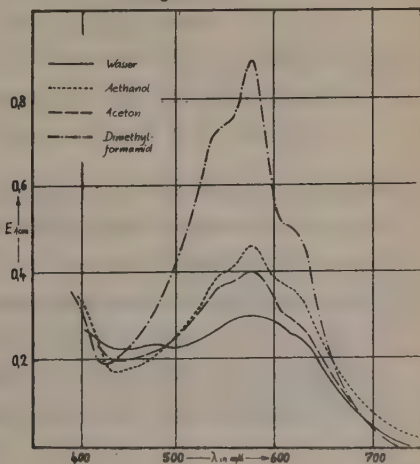


Abb.14: Oxydation mit Nitrit in verschiedenen Lösungsmitteln.



Die Auswertung der in den Abb. 13 und 14 dargestellten Spektren ergibt folgende Befunde:

- 16) Der Einfluß oxydierender Reagenzien (im vorliegenden Falle $\text{Fe}^{\dots}$ bzw. NO_2^-) führt zur zusätzlichen Entwicklung einer blauen Farbkomponente mit einem Absorptionsmaximum bei etwa $620 \text{ m}\mu$. Das Auftreten dieser langwelligeren Bande bewirkt keinen Abbau des Maximums bei $576 \text{ m}\mu$, vielmehr eher eine Erhöhung.

Für die Bildung der blauen Farbkomponente kommen nach den bisherigen Befunden 2 Möglichkeiten in Frage: entweder kann sie aus einer farblosen Vorstufe unabhängig von der violettroten Komponente entstehen, so daß sich die Absorptionen beider Formen addieren; oder die Bildung geht durch Oxydation aus der violettroten Form hervor. In diesem Falle müßte aber die so entstehende Blaukomponente auch im Bereich um $576 \text{ m}\mu$ eine kräftige Absorption besitzen.

- 17) Der Eisengehalt des vollen van U r k ' schen Reagenz' wirkt gleichartig wie eine nachträgliche Oxydation mit Nitrit, jedoch weniger stark.

Wird Nitrit vor dem Verdünnen mit Lösungsmitteln, also zu der stark sauren Reaktionsmischung zugesetzt (D), so bewirkt diese einen Abbau der Absorption bei $576 \text{ m}\mu$ und die Ausbildung eines breiten "unreinen" Absorptionsspektrums.

- 18) Ein Überschuß an Oxydationsmitteln, der schon in der Literatur über die van U r k ' sche Reaktion als nachteilig dargestellt worden ist (Smith ⁽¹⁶⁾), führt in wässriger Säure und in Mischungen von Schwefelsäure mit einigen anderen Lösungsmitteln zu einem raschen Verblässen der Reaktion; bei Verwendung von Dimethylformamid als Verdünnungsmittel ist ein Oxydationsüberschuß dagegen sehr viel weniger schädlich.

Wenn die im Befund Nr. 16) ausgesprochene Annahme einer roten und einer blauen Komponente richtig sein soll, so mußten Versuchsbedingungen gesucht werden, unter denen die eine bzw. die andere Form bevorzugt gebildet würde: Für die Bildung der Blaukomponente war eine Oxydation als erforderlich erkannt worden, doch gelang es nicht durch Steigerung des Oxydationseinflusses (bei gleichbleibenden übrigen Reaktionsbedingungen) die Ausbildung der "Blaukomponente" gegenüber der violettroten Form über ein gewisses Maß hinaus zu

steigern. Im Zuge einer Reihe von Vorversuchen erwies sich auch hier der Einfluß der Säurekonzentration als mitentscheidend für die Richtung des Reaktionsverlaufs. Dieser Faktor wurde in der folgenden Versuchsreihe eingehend geprüft.

Mit der oben genannten $0,3 \cdot 10^{-3}$ molaren Lösung L und dem eisenfreien Reagenz n.o.R. wurden die folgenden Ansätze durchgeführt:

a)	1,0 ml L + 0,5 ml n.o.R. + 4,5 ml DMF
a')	wie a) jedoch zuletzt + 1 Tropfen 0,5%ige NaNO_2 -Lösung.
b)	1,0 ml L + 0,5 ml n.o.R. + 1,0 ml 65 vol%ige H_2SO_4 + 3,5 ml DMF
b')	wie b) jedoch zuletzt + 1 Tropfen 0,5%ige NaNO_2 -Lösung.
c)	1,0 ml L + 0,5 ml n.o.R. + 1,5 ml 65 vol%ige H_2SO_4 + 3,0 ml DMF
c')	wie c) jedoch zuletzt + 1 Tropfen 0,5%ige NaNO_2 -Lösung.
d)	1,0 ml L + 0,5 ml n.o.R. + 2,5 ml 65 vol%ige H_2SO_4 + 2,0 ml DMF
d')	wie d) jedoch zuletzt + 1 Tropfen 0,5%ige NaNO_2 -Lösung.

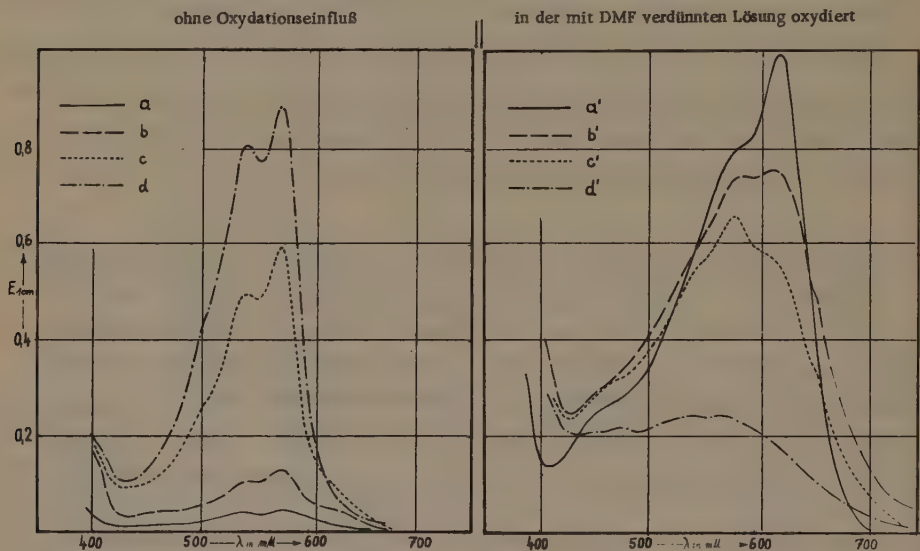
Die Zugabe des Verdünnungsmittels erfolgte auch hier unter Kühlung, die Beurteilung und Aufnahme der Spektren etwa 5 min. nach Zugabe des letzten Zusatzes.

Tab.6: Bedeutung der Säurekonzentration für die Ausbildung der roten und blauen Komponente.

Ansatz	primäre ^{x)} Säurekonzentr. g H_2SO_4 /100 ml	Farbe des Reaktionsgemischs		
		nach Zusatz von noR	nach Zusatz von DMF	nach Zusatz von NaNO_2
a	40	farblos	sehr schwach violettstichig	
a'	"	"	"	blau (langsam <u>zunehmend</u>)
b	72	gelblich	schw.violett	
b'	"	"	"	violett- <u>blau</u>
c	79	gelb	violett	
c'	"	"	"	blau-violett (langsam verblassend)
d	90	olivgelb	int.violett	
d'	"	"	"	schw.blauviolett (rasch verblassend)

x) d.h. vor Zusatz des Verdünnungsmittels.

Abb. 15: Die Bedeutung der primären Säurekonzentration für die Ausbildung der violettroten und der blauen Komponente



Die in Tab. 6 und in Abb. 15 dargestellten Untersuchungsbefunde lassen sich zu folgendem Ergebnis zusammenfassen:

- 19) Bei einer primär (d.h. im Reaktionsgemisch vor dem Verdünnen) niedrigen Säurekonzentration kommt es ohne Oxydationsmittel praktisch zu keiner Farbreaktion — auch nicht unter Anwendung des Verdünnungseffektes — d.h. die violettrote Form wird unter diesen Bedingungen fast gar nicht gebildet (Abb. 15, links, a).

Durch Oxydation eines solchen schwach sauren und nachfolgend mit DMF verdünnten, fast farblosen Ansatzes erhält man eine praktisch reine Blaukomponente (Abb. 15, rechts, a'). Diese muß im vorliegenden Falle also aus einer farblosen Vorstufe entstanden sein (vgl. hierzu 16).

- 20) Je höher die primäre Säurekonzentration, desto intensiver gelb ist das primäre Reaktionsgemisch (Tab. 6) und desto stärker tritt beim nachfolgenden Verdünnen die violettrote Komponente auf (Abb. 15, links, b, c, d).

Die Blaufärbung, die durch Oxydation der mit DMF verdünnten Lösungen erhalten wird, ist dagegen (zum oben genannten Beobachtungszeitpunkt) umso schwächer, je höher die Säurekonzentration dieser Mischung ist.

Diese Befunde legen die folgende Annahme nahe: Je mehr von der violettroten Komponente — unter Einwirkung stärkerer Säure — gebildet worden ist, desto weniger "Blau" kann durch Oxydation entstehen. Dies würde aber darauf hinweisen, daß die Blaukomponente nur aus der farblosen Vorstufe (bei primär niedriger Säurekonzentration), nicht aber aus der violettroten Form durch Oxydation entstehen kann.

Bei der Auswertung der oben beschriebenen Versuche dürfen aber zwei in der Tab. 6 wiedergegebene Beobachtungen nicht übersehen werden:

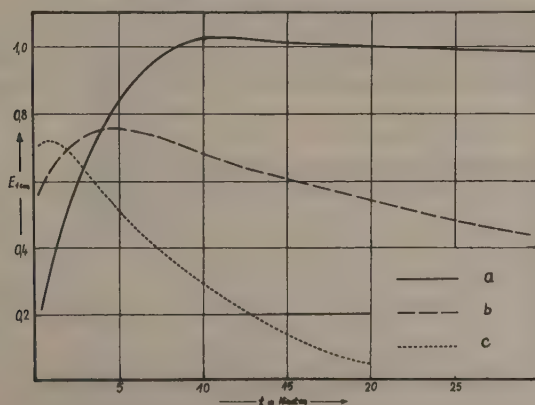
- 1.) Auch die stark sauren Ansätze c' und d' zeigen einen Anteil an Blaukomponente nach Zusatz des Oxydationsmittels.
- 2.) Diese stärker sauren Ansätze c' und d' verblassen merklich bzw. rasch, so daß die in der Abb. 15 rechts wiedergegebenen Spektren bereits ein gewisses Abbaustadium darstellen.

Diese Frage der Entwicklung und des Abbaus der Blaukomponente wurde daher in den folgenden Versuchen näher untersucht:

Je 3,0 ml der obengenannten Ansätze a, b und c wurden in eine Küvette des selbstregistrierenden Spektralphotometers eingefüllt. Zu dieser Mischung wurden jeweils 0,02 ml einer 0,5%igen Natriumnitritlösung zugesetzt, hierauf wurde sofort mit einem am Ende plattgedrückten Glasstab gemischt und 10 sec. nach dem Durchmischen mit der Messung begonnen. Hierbei wurde die Welleneinstellung bei $620\text{ m}\mu$ konstant gehalten und die zeitliche Änderung der Extinktion bei dieser Wellenlänge registriert.

Die so erhaltenen Kurven zeigt Abb. 16.

Abb. 16: Entwicklung und Abbau der Blaukomponente bei verschiedener Säurekonzentration im Endgemisch.



Aus Abb. 16 geht Folgendes sehr deutlich hervor:

- 21) Bei niedriger Säurekonzentration (a) steigt die Ausbildung der Blaukomponente (aus der farblosen Vorstufe) mäßig rasch an, um nach Erreichen eines Maximums sehr langsam abzusinken. Bei hoher Säurekonzentration (c') ist innerhalb des beobachteten Zeitraums fast kein Anstieg der Blaufärbung zu beobachten, vielmehr wird die Kurve durch einen relativ raschen Abfall der Blaukomponente unter dem Einfluß des Oxydationsmittels bestimmt.

Der unter Nr. 18) mitgeteilte Befund bedarf also noch einer wesentlichen Ergänzung:

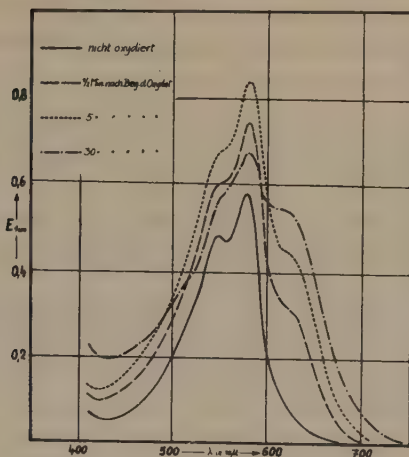
- 22) Die Entwicklung und das Verblassen der Färbung durch überschüssiges Oxydationsmittel ist weitgehend abhängig von der Stärke der Säure im Reaktionsgemisch zum Zeitpunkt des Oxydationseinflusses.

Ungeklärt war es aber bisher noch geblieben, ob die Bildung des blauen Farbstoffs auch aus der violettroten Form möglich sei. Zur Klärung dieser Frage wurde nach den oben gesammelten Erfahrungen ein Ansatz gemacht, der durch eine primär hohe Säurekonzentration eine größtmögliche Bildung der primär gelben und durch nachfolgendes Verdünnen violettroten Form erbringen sollte. Eine verhältnismäßig starke Verdünnung (vor der Oxydation) mußte einen nennenswerten Abfall während der Beobachtung ausschließen.

0,5 ml einer 10^{-3} molaren Lösung von 3-Methylindol wurde mit 1,5 ml des oben genannten eisenfreien Reagenz¹ versetzt und nach 3 min. unter guter Kühlung mit 10 ml DMF verdünnt. Diese Lösung wurde in zwei gleiche Teile zu je 6 ml unterteilt. Ein Teil wurde (als "nichtoxydierter" Vergleich) mit einem Tropfen Wasser, der andere Teil mit einem Tropfen der 0,5%igen Natriumnitritlösung versetzt. Von dem nichtoxydierten Vergleich wurden sofort nach dem Durchmischen, von dem oxydierten Teil in mehreren Zeitabständen wiederholt die Absorptionsspektren aufgenommen.

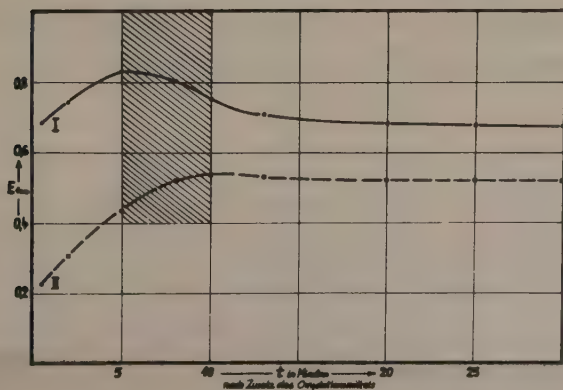
Einige der so erhaltenen Absorptionskurven zeigt Abb. 17.

Abb. 17: Die spektrale Veränderung bei fortschreitender Oxydation.



Die Entwicklung der Blaukomponente kann durch Messung der Extinktion bei $\lambda = 620 \text{ m}\mu$ (= II) in den obengenannten Versuchen (Abb. 17) fast fehlerlos verfolgt werden, da bei dieser Wellenlänge die violettrote Form nur unwesentlich ins Gewicht fällt. Eine selektive Beobachtung der violettroten Form in Gemischen ist dagegen nicht möglich, da ihr Absorptionsspektrum von der blauen Komponente weitgehend überdeckt wird. Die Messung der Extinktion bei $\lambda = 576 \text{ m}\mu$ (= I) repräsentiert daher eine Summe beider Farben. Dennoch ermöglicht die zeitliche Verfolgung dieser beiden Meßwerte wertvolle Schlüsse:

Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Extinktionsmeßwerte bei $\lambda = 576 \text{ m}\mu$ und $620 \text{ m}\mu$ während der Oxydation,



In den ersten Minuten steigen beide Extinktion/Zeit-Kurven gleichsinnig an. Dies erlaubt zunächst nur die Aussage, daß "Blau" gebildet wird. Der Anstieg der Extinktion bei $576\text{ m}\mu$ ($= I$) kann, wie in Nr. (16) erwähnt, zwei Ursachen haben: entweder

- α) die Bildung von "Blau" erfolgt aus einer gleichzeitig vorhandenen, farblosen Vorstufe, und die Absorptionen beider Formen bei $576\text{ m}\mu$ addieren sich; oder
- β) "Blau" wird aus "Violettrot" gebildet; dann müßte aber die Absorption des ersteren bei $576\text{ m}\mu$ größer als diejenige des letzteren sein.

In beiden Fällen müßten aber die Kurven I und II stets gleichsinnig verlaufen: Solange "Blau" zunimmt, müßte auch die Absorption bei $576\text{ m}\mu$ steigen. Dies ist indessen nicht der Fall:

Von der 5. bis zur 10. Minute nach Zusatz des Oxydationsmittels steigt "Blau" noch an, während I bereits abfällt (Abb. 18, schraffierte Zone).

Von etwa der 13. Minute an laufen beide Kurven wieder parallel: hier hat sich ein Reaktionsgleichgewicht eingestellt.

Der Verlauf der vorliegenden Reaktion ist daher folgendermaßen zu deuten:

- (23) Unter der Einwirkung relativ hoher primärer Säurekonzentration und nachfolgendem Verdünnen mit DMF entsteht vornehmlich die violettrote Form, zum kleineren Teil eine Leukovorstufe. Unter Oxydationseinfluß wird zunächst aus letzterer die Blaukomponente gebildet. Ist die Leukovorstufe aufgebraucht (im vorliegenden Falle nach 5 Minuten), so kann in geringerem Maße – vielleicht indirekt – auch die violettrote Form zur Bildung des blauen Farbstoffs herangezogen werden. Nach Erreichen eines gewissen Gleichgewichts ist die violettrote Form aber im Säure-Lösungsmittel-Gemisch stabilisiert und wird nicht weiter oxydiert.

Reaktionsschema.

Die in den vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Einfluß verschiedener Faktoren auf den Verlauf der Farbreaktion des 3-Methylindols (als Modell für β -substituierte Indole) mit dem p-Dimethylaminobenzaldehyd. Es wurde festgestellt, daß Säurekonzentration, Lösungsmittel und Oxydationseinfluß den Reaktionsverlauf in mannigfacher Weise zu beeinflussen, ja zu bestimmen vermögen. Das im folgenden wiedergegebene Schema zeigt die wichtigsten Möglichkeiten des Reaktionsablaufes zunächst rein phänomenologisch. Dargestellt sind hierbei jeweils Extrembedingungen. In praxi liegen Gleichgewichte zwischen den hier wiedergegebenen Reaktionsschemata vor, die allerdings -- je nach den Bedingungen -- stark nach der einen oder anderen Seite hin verschoben sein können.

Aus dem Schema ist das Reaktionsgeschehen bei Anwendung verschiedener Arbeitsmethoden zu ersehen: Beispielsweise zeigt der folgende Gang

"Kondensation stark sauer $\rightarrow$ [gelbe "Leuko"-Form] -
- Oxydation in stark saurer Lösung mit wenig Fe^{+++}
 $\rightarrow$ [wenig blauer Farbstoff neben überwiegend nicht
oxydierter "gelber Form"] "

den Reaktionsablauf bei Anwendung des üblichen van Urk'schen Reagens¹ und in der normalen Ausführungsform. Der Vergleich mit den Reaktionsschemata rechts und links demonstriert die Unzweckmäßigkeit dieses "klassischen" Verfahrens -- jedenfalls für 3-Methylindol.

Reaktionsschema (phaenomenologisch)

3-Methylindol + p-Dimethylaminobenzaldehyd
(Überschuss)

Kondensation
schwach sauer

Kondensation
stark sauer

Leukoform
farblos

gelbe („Leuko“-)Form
d.h. nicht oxydierte, in stark saurer Lösung
gelb erscheinende Form mit breitem Absorpt.-
spektrum

s. Abb. 6, gestrichelt

Verdünnung

Verdünnung mit
Lösungsmittel

Oxydation
(langsam)

Oxydation in
stark saurer Lösung

unverändert:

Leukoform
farblos

Violettrote Form
mit scharfer Absorpt.-bande
 $\lambda_{max} 576 m\mu$

s. Abb. 12

Oxydation

a.) schw. Oxydat.
(mit wenig Fe^{+++})

b.) starker
Oxydations-
einfluss

Oxydation in der
mit Lösungsmittel
verdünnt. Mischung

Blauer Farbstoff

s. Abb. 15, a'

wenig
Blauer Farbstoff
neben überwiegend
nicht oxyd. „gelber“ Form

s. Abb. 6, punktierte Kurve

Gleichgewicht
Blauer Farbstoff
+ violettrote Form

s. Abb. 13, B bzw. C

Zersetzung

Präparative Darstellung und Kennzeichnung der Reaktionsprodukte.

Die im bisherigen experimentellen Teil der Arbeit geschilderten Beobachtungen und spektralphotometrischen Untersuchungen erbrachten eine Reihe von Befunden über den Verlauf der Reaktion unter dem Einfluß verschiedener Arbeitsbedingungen. Die erzielten Ergebnisse waren aber überwiegend phänomenologisch-deskriptiver oder quantitativ-messender Art und erbrachten noch keine Aussage über den "Chemismus" der Reaktion: Es wurden gelbe, violettrote und blaue "Komponenten" festgestellt bzw. es wurde auf die Existenz farbloser Vorstufen geschlossen. Um den eigentlich chemischen Ablauf der Farbreaktion aufzuklären war es somit erforderlich, die — bisher nur in ihren optischen Effekten studierten — Reaktionsprodukte präparativ in reiner Form zu gewinnen, sie zu analysieren und ihre Eigenschaften zu kennzeichnen.

Ein prinzipielles Problem dieser Arbeitsrichtung liegt darin, daß bei der präparativen Darstellung der Reaktionsprodukte nicht unter ganz gleichartigen Bedingungen gearbeitet werden kann, wie sie beim analytischen Gebrauch der Reaktion vorliegen. Jedenfalls muß angestrebt werden, die präparative Arbeitsweise wenigstens in ihren Grundzügen dem analytischen Modus anzugleichen. Die Identität der analytisch festgestellten und der präparativ gewonnenen Komponenten muß dann schließlich durch spektralphotometrischen Vergleich sichergestellt werden.

Wie eingangs erwähnt (s. S. 7), wird beim analytischen Gebrauch der Reaktion zum Nachweis von Indolkörpern stets mit einem Überschuß an Aldehyd gearbeitet. Diese Verhältnisse wurden bei den zunächst beschriebenen präparativen Versuchen ebenfalls gewählt. Ein hoher Aldehydüberschuß wurde dabei allerdings vermieden, um die Isolierung der Reaktionsprodukte nicht unnötig zu erschweren.

Als erstes Ziel wurde zunächst die Darstellung der ohne Oxydationseinfluß entstehenden violettroten Farbkomponente angestrebt. Um die beiden Reaktionskomponenten 3-Methylindol und p-DAB in höherer Konzentration überhaupt in Lösung zu bringen, mußten organische Lösungsmittel benutzt werden, wobei sich Aethanol und Methanol am besten eigneten. Damit war eine der notwendigen

Bedingungen für die Bildung der violettroten Farbkomponente (nämlich organisches Lösungsmittel) schon vorgegeben.

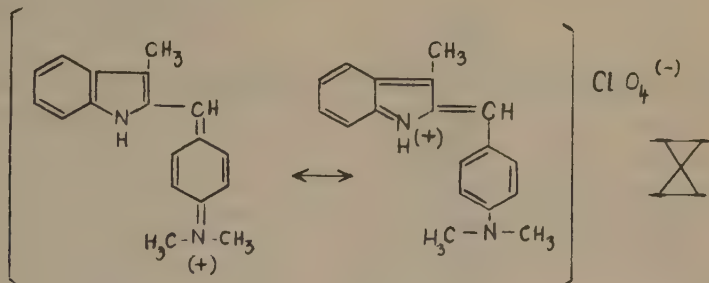
Eine Reihe von Ansätzen mit Schwefelsäure bzw. mit Salzsäure als Kondensationsmittel erbrachten — auch bei verschiedenen Modifikationen im Ansatz und in der Aufarbeitung — kein reines, kristallines, einheitliches Produkt. Vielmehr wurden — spektralphotometrisch nachweisbar — stets Gemische der violettroten und der nach Blau oxydierbaren Leukoform erhalten. Sowohl Ausschüttelung der nachträglich mit Wasser verdünnten Ansätze als auch Ausfällung durch Eingießen in ein größeres Volumen angesäuerten Wassers erbrachten höchstens eine Anreicherung, aber kein reines Produkt.

Dagegen konnte durch Verwendung von Perchlorsäure, wie dies zuerst von H. Fischer und Nenitzescu⁽⁴⁶⁾ für Pyrrolfarbstoffe gezeigt und später von Treibs und Herrmann⁽²⁰⁾ auch für Indolfarbstoffe benutzt wurde, eine Isolierung des violettroten Farbstoffs in einfacher Weise erzielt werden. Die von Treibs und Herrmann angegebene Vorschrift wurde für den vorliegenden Fall etwas modifiziert:

1,31 g Skatol, gelöst in 10 ml Aethanol, wurden in eine auf etwa 50° vorgewärmte Lösung von 1,86 g p-DAB (=25% Überschuß) + 2 g der handelsüblichen 70%igen wässrigen Perchlorsäurelösung in 40 ml Aethanol unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer rasch eingetropft. Danach wurde unter weiterem Rühren bis auf etwa 70° erwärmt. Nach wenigen Minuten setzte die Ausscheidung von Kristallen ein. Nach langsamem Abkühlenlassen der Mischung, zunächst auf Zimmertemperatur und schließlich im Kühlschrank, wurde der Niederschlag abgesaugt, mit Wasser, eiskaltem absolutem Aethanol und reichlich Aether gewaschen und danach einmal aus Aethanol umkristallisiert. Die so erhaltenen schwarzvioletten feinen Nadeln zeigten einen Schmelzpunkt von 213° (Kofler, Mikro).

Analyse	berechnet für [C ₁₈ H ₁₉ N ₂]ClO ₄	gefunden:
C	59,59	59,6
H	5,28	5,3
N	7,72	7,9
Cl	9,77	9,7
O	17,64	17,2
ClO ₄	27,41	27,99 (direkt titriert)

Die Verbindung entspricht somit der oben genannten Bruttoformel; die Formulierung von Treibs und Hermann als diejenige eines [3-Methylindolyl-(2)] - [p-dimethylaminophenyl]-methen-perchlorats darf somit, d.h. unter Mitheranziehung der oben zitierten Arbeiten ^{x)} als richtig gelten (X).



Untersuchungen am isolierten roten Farbstoff X.

Es war nunmehr festzustellen, ob das Kation dieses Farbsalzes mit der im vorhergehenden Teil der Arbeit beschriebenen "violettroten Komponente" identisch sei. Hierüber mußte, wie oben gesagt, das spektralphotometrische Verhalten Aufschluß geben. Darüber hinaus schien es für die nähere Kenntnis der Farbreaktion wertvoll, das Absorptionsverhalten dieses Farbstoffs unter verschiedenen Bedingungen ganz allgemein zu untersuchen:

Das Salz löst sich in Alkoholen, Aceton, Eisessig und Dimethylformamid ausreichend leicht mit einer — je nach dem Lösungsmittel — überaus unterschiedlichen Farbintensität (s. Tab. 7). Die Färbung, besonders der schwach gefärbten Lösungen, wird aber erheblich verstärkt, wenn einer solchen Lösung freie Säure zugesetzt wird, wie die folgenden, mit Methanol durchgeführten Versuche zeigen.

x) siehe hierzu u. A. Feist, Etienne und Heymes, Longuet-Higgins und Coulson, Terentjew und Janowskaja, v. Dobeneck und Maresch.

Tab. 7: Farbintensität des roten Farbstoffs (X-Perchlorat) in verschiedenen Lösungsmitteln.

Konzentration: 1,0 mg / 100 ml.

Lösungs- mittel	E ₁ cm gemessen bei $\lambda = 575 \text{ m}\mu$	Änderung der Farbintensität auf Zusatz von Säure
Wasser	0,18	Zunahme
Methanol	0,33	"
Aethanol	0,10	"
Eisessig	0,35	"
DMF	0,00	"
Aceton	1,9	Abnahme

Um den Einfluß der Säurekonzentration zu verfolgen wurden jeweils 1,5 mg des Perchlorats (X) in reinem Methanol bzw. in Mischungen von Methanol und 43 vol%iger Schwefelsäure gelöst und die Extinktion dieser Lösungen bei $\lambda = 576 \text{ m}\mu$ gemessen (Tab. 8).

Tab. 8:

	Lösungsmittelgemisch		Säurekonzentration	E ₁ cm
	Methanol	43 vol%ige H ₂ SO ₄	im Endgemisch vol% H ₂ SO ₄	gemessen bei $\lambda = 576 \text{ m}\mu$
I	100 ml	+	0 ml	0,19
II	90 ml	+	10 ml	0,26
III	75 ml	+	25 ml	0,39
IV	50 ml	+	50 ml	0,93
V	40 ml	+	60 ml	0,94
VI	35 ml	+	65 ml	0,58
VII	30 ml	+	70 ml	0,39
VIII	10 ml	+	90 ml	0,14

Abb. 19 zeigt einige der so erhaltenen Absorptionsspektren, Abb. 20 die Abhängigkeit der Farbintensität von der Säurekonzentration.

Abb. 19: Roter Farbstoff (X) / Änderung des Absorptionsspektrums mit zunehmender Säurekonzentration.
Lösungsmittel: Methanol

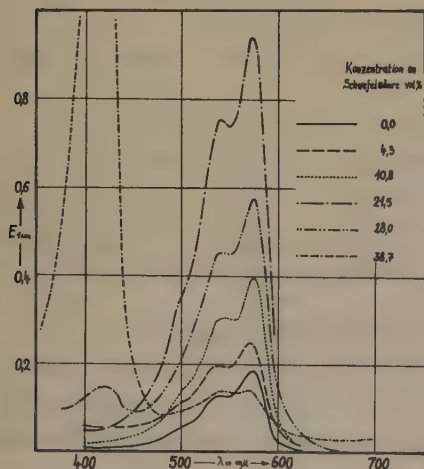
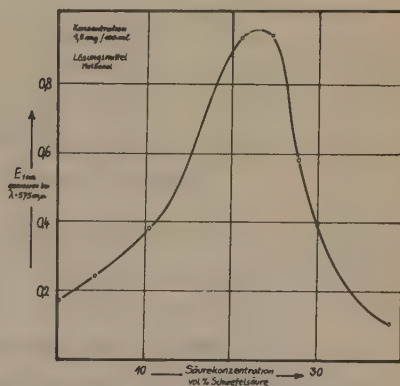
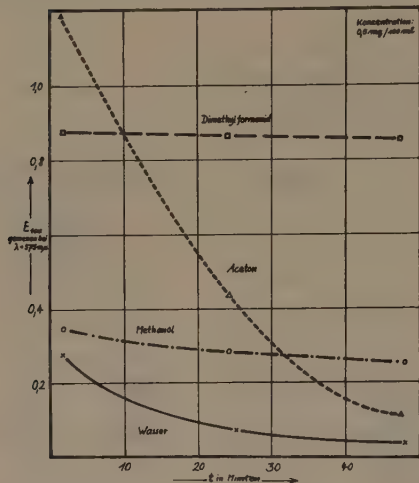


Abb. 20: Roter Farbstoff (X) / Abhängigkeit der Farbintensität von der Säurekonzentration im Lösungsgemisch.



In einer weiteren Versuchsreihe wurden Mischungen entsprechend dem oben dargestellten Ansatz IV, jedoch mit 0,5 mg / 100 ml hergestellt, bei welchen anstelle des Methanols andere Lösungsmittel eingesetzt wurden. Sie erbrachten Absorptionskurven, die eine fast völlige Übereinstimmung mit denjenigen der Abb. 12 zeigten (s. dort). Von diesen Ansätzen wurde die Farbstabilität im Spektralphotometer bei $\lambda = 575 \text{ m}\mu$ zeitlich verfolgt. Die so erhaltenen Zeit / Extinktionskurven zeigt Abb. 21.

Abb. 21: Farbstabilität des roten Farbstoffs (X) in Schwefelsäure-Lösungsmittel-Gemischen.



Aus den Darstellungen der Tab. 7 und den Abb. 19, 20 und 21 lassen sich die folgenden Befunde direkt ablesen:

- 24 [3-Methylindolyl-(2)] - [p-dimethylamino-phenyl]-methen zeigt in Säure-Lösungsmittel-Gemischen ein völlig entsprechendes Absorptionsspektrum wie die im vorhergehenden Teil der Arbeit beschriebene "violettrote Komponente": Hauptabsorptionsmaximum bei $\lambda = 574 \text{ m}\mu$, Nebenmaximum bei $541 \text{ m}\mu$ (vergl. hierzu die Abb. 12 und 19).

Die beiden Körper können somit als identisch angesehen werden.

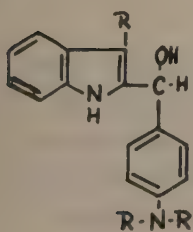
- 25 Die Farbintensität des [3-Methylindolyl-(2)] - [p-dimethylamino-phenyl]-methen-perchlorats zeigt eine starke Abhängigkeit von der Art des angewandten Lösungsmittels. Bei den meisten Lösungsmitteln (Ausnahme: Aceton) nimmt die Farbintensität mit steigendem Säurezusatz zum Lösungsgemisch bis zu einem bestimmten optimalen Wert zu, (der bei Verwendung von Methanol bei etwa 25 vol% Schwefelsäure liegt). Bei noch höherer Säurekonzentration kommt es unter Rückgang der violettroten Farbe zum Aufbau einer Absorptionsbande bei etwa $410 \text{ m}\mu$. Diese stimmt also mit der früher festgestellten "Gelbkomponente" überein (vergl. hierzu Befund Nr. 7, Seite 17).

- 26) Auch die Stabilität der Färbungen in Säure-Lösungsmittelgemischen (bei gleicher Säurekonzentration) ist erheblich von der Art des Lösungsmittels abhängig. Unter den geprüften Lösungsmitteln zeigen Mischungen mit Dimethylformamid die beste Farbstabilität.

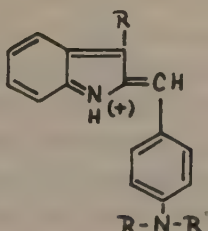
Diskussion dieser Ergebnisse:

Die Übergänge von einer farblosen über eine mehr oder minder intensiv rote, eine schwach rote zu einer gelben Form sind zweifellos durch Ladungsunterschiede bedingt: Die farblose, bzw. schwach gelbliche Carbinolbase (Xa) besitzt keine ⁽⁺⁾Ladung. Das rot gefärbte Salz Xb ist einfach positiv geladen, wie aus der Analyse klar hervorgeht (1 ClO₄⁽⁻⁾ auf 1 Methen⁽⁺⁾).

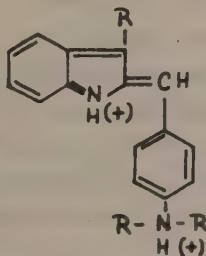
Die "Entfärbung" des violettroten Farbstoffs durch starke Säure (im vorliegenden Falle wohl gleichzusetzen mit der Umwandlung in die gelbe Form) erklären Treibs und Herrmann bei Pyrrol-p-DAB-Farbstoffen mit einer zusätzlichen Salzbildung der Dimethylamino-Gruppe. v. Dobeneck und Prietzel⁽⁴⁷⁾ sprechen von einer Ausschaltung dieser Gruppe als Chromophor infolge Bildung eines Dihydrochlorids (bei starker Salzsäure). Die Autoren nehmen also die Aufnahme eines zweiten Protons (→ Xc) für die Entfärbung (bzw. Gelbfärbung) an. Für diese Annahme spricht die Tatsache, daß mit Benzaldehyd — also bei Fehlen der Dimethylaminogruppe — keine Rotfärbung zu erhalten ist, wohl aber in stark saurer Lösung eine Gelbfärbung. Bei der erforderlichen sehr hohen Protonenkonzentration ist aber auch die Bildung eines dreifach positiv geladenen Kations (Xd) denkbar. Umgekehrt setzt in verdünnter Lösung, ohne zusätzliche H-Ionen, Solvolyse ein unter Bildung der farblosen Form Xa.



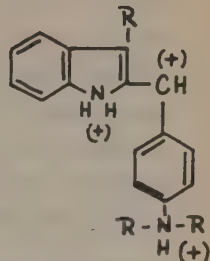
X_a



X_b



X_c



X_d

Ausschlaggebend für die Ausbildung der Farbe ist also jedenfalls die Ladung des Methenkörpers. Diese ist aber zweifellos abhängig von der Protonenkonzentration in der Lösung: Löst man das rote Perchlorat X in reinem Methanol auf, so wird dem Farbstoff ein Teil seiner notwendigen Ladung entzogen; fügt man nun zusätzliche Protonen (in Form wässriger Schwefelsäure) in geeigneter Menge zu, so wird das Gleichgewicht wieder hergestellt und die maximale Farbstärke erreicht. Noch deutlicher ist der Effekt bei DMF, das einen noch stärkeren Protonenacceptor darstellt.

In diesem Sinne erfährt auch der auf Seite 21 beschriebene und auf Seite 25 vorläufig erklärte "Verdünnungseffekt" eine klare Deutung: Bei der primär angewandten hohen Säurekonzentration wird die zwei- bzw. dreifach ⁽⁺⁾-geladene gelbe Form gebildet. Der Zusatz von Lösungsmittel bewirkt eine Verminderung der Protonenkonzentration im Reaktionsgemisch. Damit stellt sich ein Protonengleichgewicht ein, das dem Niveau des einfach positiv geladenen Farbstoff-Ions entspricht. Der Vorgang ist also mit einer Pufferung vergleichbar.^{x)} (Die auf Seite 25 beschriebenen Leitfähigkeitswerte stimmen hiermit sinngemäß überein, wenn sie auch keine streng richtigen Meßwerte für die Protonenkonzentration darstellen.)

Darstellung der Leukoverbindung.

Die Möglichkeit zur Gewinnung des reinen roten Farbstoffes nach dem oben beschriebenen Verfahren war vornehmlich durch zwei Tatsachen gegeben: 1.) Die Bildung dieser "violettroten Komponente" verläuft, wie schon weiter oben erwähnt, unter den geschilderten Bedingungen (nämlich Überschuß an Aldehyd, relativ starke Säure und Gegenwart von Lösungsmittel) in guter Ausbeute. 2.) Das Perchlorat des roten Farbstoffs ist ziemlich schwer löslich. Daß der Ansatz aber nicht zu einer völlig einheitlichen Reaktion geführt hatte, war daraus zu ersehen, daß das beim Absaugen des Farbsalzes erhaltene Filtrat auf Zusatz von Nitrit sofort eine kräftige Blaufärbung ergab. Es war also die Leukovorstufe des blauen Farbstoffs als Nebenprodukt gebildet worden und in Lösung geblieben. Da nach den eingangs zitierten Befunden der Literatur

x) Ob über diesen Puffereffekt hinaus vielleicht noch eine andersartige Farbwirksamkeit der Lösungsmittel in Betracht kommt, soll hier nicht angeschnitten werden.

für diese Leukoform eine Kondensation von 2 Mol Skatol mit 1 Mol p-DAB zu erwarten war, wurde für ihre präparative Darstellung dieses Verhältnis der Reaktionspartner gewählt. Nach den unter Nr. (19) (s. S. 32) mitgeteilten Erfahrungen erschien es hierbei zweckmäßig die Säurekonzentration relativ niedriger zu halten:

Eine Lösung von 2,6 g Skatol + 1,5 g p-DAB in 15 ml Methanol wurde mit 1,5 ml 25%iger Salzsäure versetzt.^{x)} Diese Mischung wurde im offenen Becherglas auf einer Heizplatte mit Magnetrührer unter ständigem Rühren auf etwa 60° erwärmt bis die Ausscheidung kleiner, farbloser, sandiger Kristalle zu beobachten war. Nach zweistündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurden die Kristalle auf einer Fritte gesammelt, reichlich mit kaltem Methanol und mit Aether gewaschen und schließlich getrocknet. F (unter Zersetzung): 205-206°.

Umkristallisation aus Methanol oder Aethanol ergab größere aber schwach blau gefärbte Kristalle von gleichem oder wenig niedrigerem Schmelzpunkt.

Analyse	berechnet für	gefunden:
	$C_{27}H_{27}N_3HCl$	
C	75,42 %	75,2 %
H	6,56 %	6,5 %
N	9,77 %	9,8 %
Cl	8,25 %	8,1 %
		8,30 (durch direkte Titration mit NaOH in Alkohol-Chloroform).

Unter der Annahme einer Kondensation in α -Stellung, die die größte Wahrscheinlichkeit besitzt (s. oben zitierte Literatur (8, 9, 10, 11, 12)), stellt die so erhaltene Verbindung das α, α' -Di-skatyl-[p-dimethylamino-phenyl]-methanhydrochlorid dar (XI).

x) Der Ansatz zeigte eine deutliche, gelbstichig-violettrote Färbung. D.h., also, auch unter diesen Bedingungen findet eine – wenngleich geringe – Kondensation im Verhältnis 1:1 statt.

Zur ergänzenden Kennzeichnung wurde noch die freie Base der Verbindung XI dargestellt:

Eine auf etwa 50° erwärmte Lösung des Hydrochlorids (XI) in 90%igem Aethanol wurde mit 0,1 n Natronlauge auf eben phenolphthaleinalkalisch titriert, dann einige Stunden stehen gelassen. Die ausgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt, zunächst mit Wasser, danach mit reichlich Methanol gewaschen und schließlich getrocknet.

F: 213-214°.

Titration mit 0,1 n HClO₄ in Eisessig:

Aequivalent	berechnet: 1,0 ml = 0,03935 g
	gefunden: 0,0391

Untersuchungen an der Leukoverbindung XI.

Die Bedeutung einer "Leukoform" als Vorstufe des blauen Farbstoffs war in vorhergehenden Kapiteln wiederholt angeschnitten worden. Nachdem diese nun in reinem Zustand und chemisch definiert zur Verfügung stand, erschien es wertvoll, an diesem Objekt eingehendere Studien über die Oxydation zum blauen Farbstoff durchzuführen:

Der starke, z. T. bestimmende Einfluß der Säurekonzentration auf verschiedene Phasen der Farbreaktion war in vorhergehenden Abschnitten mehrfach behandelt worden. (Im Kapitel über den "Verdünnungseffekt" und in der Diskussion über das Farbverhalten des roten Methens X war gezeigt worden, daß in Mischungen mit Lösungsmitteln der Begriff der Protonenkonzentration an die Stelle derjenigen der Säurekonzentration zu treten habe.) So war zu erwarten, daß auch die Oxydationsphase XI → blauer Farbstoff eine Abhängigkeit von der "Säurenstärke" zeigen werde:

Jeweils 0,43 mg (= 10⁻⁶ Mol) der Leukoverbindung XI wurden in einem 50 ml-Meßkolben in 49 ml Schwefelsäure verschiedener Stärke gelöst. Hierzu wurde 1,0 ml einer 0,001 n NaNO₂Lösung (= 1 Aequivalent, bezogen auf die Einwage) zugesetzt. Dann wurde schnell gemischt und die Lösung in eine Küvette eingefüllt. Genau 20 sec. nach dem Durchmischen wurde mit der Messung begonnen. Bei konstanter Einstellung der Wellenlänge (620 mμ) wurde die zeitliche Entwicklung der Blaufärbung als Extinktion E_{1 cm} verfolgt (Abb. 22).

30 min. nach dem Durchmischen wurde von einigen Ansätzen das Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 23).

Abb. 22: Entwicklung der Blaufärbung durch Nitrit in Schwefelsäure verschiedener Stärke.

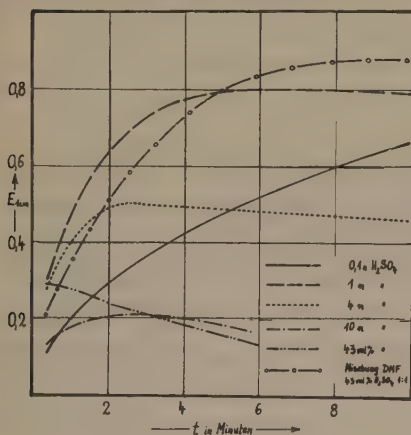
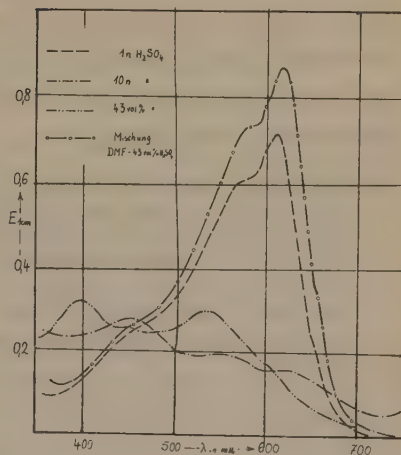


Abb. 23: Absorptionsspektren zur Nitrit-Oxydation in Schwefelsäure verschiedener Stärke.



Die in den Abb. 22 und 23 dargestellten Versuchsergebnisse erlauben die folgenden Feststellungen:

27 Der zeitliche Verlauf der Oxydation mit Nitrit hängt deutlich von der Stärke der Säure im Reaktionsgemisch ab. In 0,1 n Schwefelsäure verläuft die Reaktion ziemlich langsam. In 1 n Schwefelsäure wird der maximale Farbwert nach etwa 5 bis 6 min. erreicht. Bei noch stärkerer Säure werden dagegen deutlich schwächere Blaufärbungen erhalten. Die Mischung DMF - 43 vol%ige Schwefelsäure (1+1) zeigt unter den geprüften Säuregemischen die zugleich stärkste und stabilste Blaufärbung.

28 Die Oxydation mit Nitrit verläuft nur in relativ schwacher Säure streng einheitlich im Sinne einer Bildung des blauen Farbstoffs. Das so erhaltene Absorptionsspektrum stimmt mit dem früher erhaltenen (Abb. 15, rechts, a') überein.

In starker Schwefelsäure entstehen durch Nitritoxydation Reaktionsgemische von unreiner Farbe mit einem niedrigen und instabilen Anteil an blauem Farbstoff (vergl. hierzu Abb. 15, rechts, d' und Befund Nr. 22).

Von besonderer Bedeutung für einen optimalen Ablauf der Oxydation mußte selbstverständlich auch die Menge des anzuwendenden Oxydationsmittels sein. In den vorhergehenden Versuchen war 1 Mol NaNO_2 auf 1 Mol Leukoverbindung XI angewandt worden. Die folgenden Versuche sollten zeigen, ob dieses Verhältnis das stöchiometrisch richtige für eine optimale Oxydation sei, und inwieweit ein Überschuß an Oxydationsmittel – bei geeigneter Säurenstärke – den Reaktionsverlauf beeinflusse:

Jeweils 0,43 mg ($= 10^{-6}$ Mol) der Leukoverbindung XI wurden in einem 50 ml-Meßkolben in 45 ml 1 n Schwefelsäure gelöst. Hierzu wurden steigende Mengen einer 0,001 n NaNO_2 Lösung zugesetzt. Dann wurde mit 1 n Schwefelsäure zur Marke aufgefüllt und schnell gemischt. Genau 20 sec. nach dem Durchmischen wurde mit der Messung begonnen. Auch hier wurde bei konstanter Einstellung der Wellenlänge (620 m μ) die zeitliche Entwicklung der Blaufärbung als Extinktion bei den verschiedenen Ansätzen verfolgt (Abb. 24).

30 min. nach dem Mischen wurde von 2 Ansätzen das Absorptionsspektrum aufgenommen (Abb. 25).

Abb. 24: Entwicklung der Blaufärbung bei steigendem Zusatz von Nitrit.

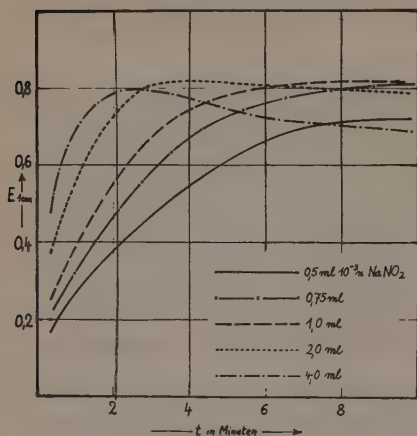
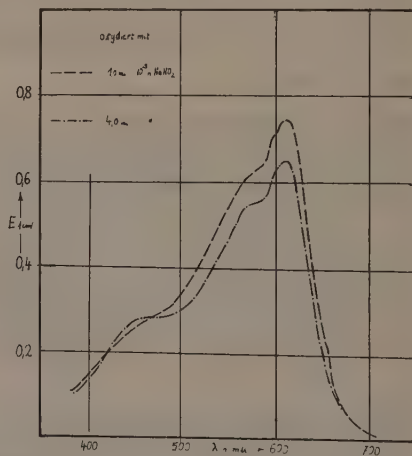


Abb. 25: Absorptionsspektren zur Nitrit-Oxydation mit Äquivalenter Menge und mit überschüssigem Nitrit.



Die Auswertung der Kurven und der Absorptionsspektren der Abb. 24 und 25 ergibt die folgenden Befunde:

- 29) Bei der Oxydation der Leukoverbindung XI mit Nitrit in 1 n Schwefelsäure wird mit weniger als 1 Mol des Oxydationsmittels der maximale Farbwert

erreicht. Bei Anwendung eines Überschusses an Nitrit erfolgt die Entwicklung der Farbe schneller, die Färbung ist aber weniger beständig.

- 30 Ein starker Überschuß an Nitrit (in 1 n Schwefelsäure) führt zu einer Veränderung des Absorptionsspektrums: Unter Abbau der Blaufärbung (Absorptionsbande bei $\lambda = 620 \text{ m}\mu$) kommt es in stärkerem Maße zur Ausbildung einer Absorption bei etwa $455 \text{ m}\mu$, also zu einer Sekundärreaktion. Im Vergleich zum Einfluß starker Säure (s. Abb. 23, Befund Nr. 28) ist ein Überschuß an Oxydationsmittel in 1 n Schwefelsäure aber relativ wenig "schädlich". Vergl. hierzu Befund Nr. 22.

Nach dem unter Nr. 29 mitgeteilten Befund einer maximalen Farbentwicklung mit weniger als 1 Mol Natriumnitrit pro 1 Mol Leukoverbindung XI schien es interessant, auch noch Versuche mit anderen Oxydationsmitteln durchzuführen. Um den Anschluß an die vorhergehenden Versuche zu wahren und um sekundäre Zersetzungsreaktionen möglichst zu unterdrücken (vergl. Befund Nr. 28), wurde auch hier in 1 n Schwefelsäure als Reaktionsmedium gearbeitet:

Wie in den vorhergehenden Versuchen wurden jeweils $0,43 \text{ mg}$ ($= 10^{-6} \text{ Mol}$) der Leukoverbindung XI in einem 50 ml Meßkolben in etwa 40 ml n Schwefelsäure gelöst. Hierzu wurden $1,0 \text{ ml}$ (bzw. ein Mehrfaches) der betreffenden Oxydationsmittel in $0,001 \text{ n}$ Lösungen zugesetzt, mit n Schwefelsäure zur Marke aufgefüllt und schnell gemischt. Von der $20. \text{ sec.}$ an, gerechnet vom Beginn des Mischens, wurde die zeitliche Entwicklung der Blaufärbung durch Messen der Extinktion bei $\lambda = 620 \text{ m}\mu$ verfolgt.

Während die Ansätze mit Eisen^{III}chlorid und mit Kaliumbromat nur eine sehr langsame Entwicklung der Blaufärbung zeigten, reagierten Cer^{IV}sulfat und Kaliumpermanganat fast augenblicklich, so daß innerhalb der Vorbereitungszeit von 20 sec. die Entwicklung bereits vollständig abgelaufen war, also kein aufsteigender Ast der Kurve gefaßt werden konnte. Nachdem bei Anwendung von $1,0 \text{ ml}$ der 10^{-3} n Lösung bei einigen Oxydationsmitteln zwar konstante aber nur schwache Färbungen resultierten, wurden hier Ansätze auch mit größeren Mengen an Oxydans durchgeführt.

Abb. 26 zeigt einige Farbentwicklungskurven, dargestellt als Extinktion/Zeit-Diagramm. Abb. 27 gibt eine Übersicht über die für eine maximale Farbentwicklung erforderlichen Mengen an Oxydationsmittel. Sie ermöglicht gleichzeitig

einen Vergleich über die mit verschiedenen Oxydationsmitteln erzielbare größte Farbintensität.

Die Extinktionswerte für die Abb. 27 sind jeweils zum Zeitpunkt der höchsten Farbentwicklung entnommen: für Cerisulfat und Permanganat 30 sec., für Natriumnitrit 6 min., für Dichromat 2 h nach Ansetzen der Reaktion.

Abb. 26: Entwicklung der Blaufärbung unter dem Einfluß verschiedener Oxydationsmittel.

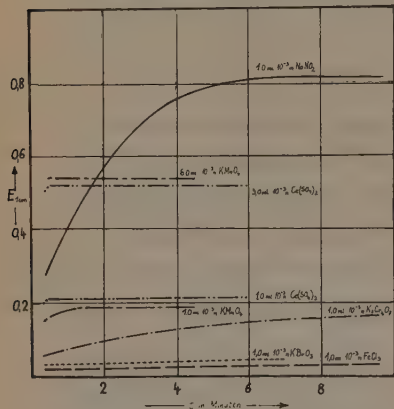
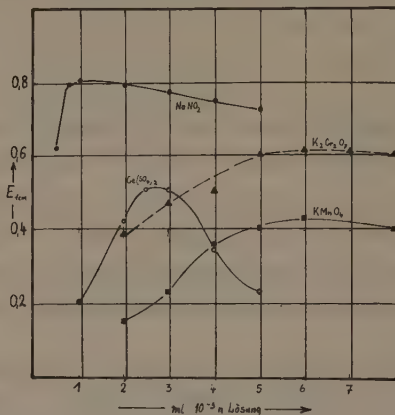


Abb. 27: Ausbildung der Blaufärbung in Abhängigkeit von der zugesetzten Menge verschiedener Oxydationsmittel.



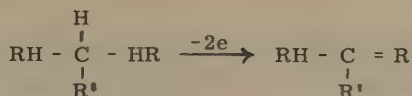
Aus den Darstellungen der Abb. 26 und 27 ist zu entnehmen:

- 31 Eisen^{III} und Bromat oxydieren in 1 n Säure die Leukoverbindung XI nur äußerst langsam zum Farbstoff; etwas schneller wirkt Dichromat. Cer^{IV}-sulfat und Permanganat oxydieren außerordentlich schnell.
- 32 Die für eine maximale Farbentwicklung erforderliche Menge an Oxydans ist bei verschiedenen Oxydationsmitteln verschieden. Ein stöchiometrisches Verhältnis läßt sich daraus nicht ablesen.
- 33 Die durch Nitritoxydation erzielbare Farbintensität wird durch Einwirkung anderer Oxydationsmittel nicht erreicht.

Diskussion dieser Ergebnisse:

Für eine Oxydation der Leukoform XI zum blauen Farbstoff war nach allen bisher vorliegenden Befunden der Literatur eine Dehydrierung des Methans XI

zum entsprechenden Methen, also die Abgabe von 2 Elektronen zu formulieren:



Für die Funktion des Nitrits als Oxydationsmittel gilt im Allgemeinen der Übergang von NO_2^- nach NO , also die Aufnahme eines Elektrons. (Die 0,1 n Natriumnitritlösung für die Maßanalyse ist daher 0,1 molar). Für die obige Formulierung müßten also 2 Mol NaNO_2 pro 1 Mol Leukoverbindung XI erforderlich sein. Tatsächlich wurde aber nur knapp 1 Mol für eine maximale Farbentwicklung verbraucht. Die Erklärung hierfür ist darin zu suchen, daß Nitrit bei der Reaktion mit einem solchen, relativ kräftigen Reduktionsmittel wie es die Leukoverbindung XI darstellt über die NO -Stufe hinaus zum N_2O oder zum elementaren Stickstoff reduziert werden kann, wodurch entsprechend mehr Elektronen aufgenommen werden. Schließlich kann das primär entstehende NO mit dem in der Lösung vorhandenen (gelösten) Sauerstoff Stickstoffdioxid bilden, das seinerseits oxydierend wirkt. —

Umgekehrt wie beim Nitrit ist bei den geprüften starken Oxydationsmitteln Ce^{IV} , Dichromat und Permanganat der Verbrauch zur Erzielung einer maximalen Farbtintensität höher als erwartet. Dies ist daraus zu erklären, daß bei der Einwirkung dieser Oxydantien außer der Dehydrierung zum Methenfarbstoff noch andere Oxydationsprozesse (nämlich unter Bildung farbloser Reaktionsprodukte) ablaufen. Solche Nebenreaktionen treten bei Nitrit erst sekundär, in merklichem Umfang nur bei Anwendung eines Überschusses auf; bei den starken Oxydationsmitteln setzen sie dagegen von Anfang an ein und verlaufen mit einer Reaktionsgeschwindigkeit, die der eigentlichen Farbstoffbildung nicht wesentlich nachsteht. Tatsächlich wurden bei der Nitritoxydation einerseits und bei der Ce^{IV} - oder Permanganatoxydation andererseits unterschiedliche UV-Spektren festgestellt.

Der blaue Farbstoff

Darstellung

Eine weitergehende Klärung des Reaktionsgeschehens war nach den oben genannten Befunden aber nur durch Isolierung und Kennzeichnung des blauen Reaktionsproduktes zu erhalten.

Nach der oben erwähnten, in der Literatur vorliegenden Deutung der Farbstoffbildung, nämlich einer Dehydrierung des Methans XI zum entsprechenden Methen, sowie nach den im vorhergehenden Abschnitt dargestellten Erfahrungen über die Bedingungen eines optimalen Reaktionsablaufes war eine reibungslose präparative Darstellung des blauen Farbstoffs zu erwarten. Auffallenderweise war die Reindarstellung und Analyse dieses Produktes aber bisher nicht beschrieben worden.

Die hier durchgeführten Versuche zeigten nun sogleich erhebliche Schwierigkeiten: Es gelang zwar leicht aus der reinen Leukoverbindung XI durch Oxydation mit Nitrit bei geeigneter Säurenstärke und in verschiedenen Lösungsmitteln tiefblaue Reaktionsgemische zu erhalten, es war aber weder durch Auswahl des Lösungsmittels, noch durch Variation der Säure, noch durch Reinigungsverfahren wie Ausschüttelung oder Chromatographie an verschiedenen Adsorbentien möglich, das gesuchte Farbsalz aus Lösung kristallisiert zu erhalten. Das Produkt zeigte sich in den geprüften Lösungsmitteln entweder viel zu leicht löslich (Alkohole, Aceton, Chlorkohlenwasserstoffe, Dimethylformamid) oder fast unlöslich (Petroläther, Äther, Benzol). Auch Wasser und Essigester zeigten keinen ausreichenden Löslichkeit/Temperatur-Koeffizienten, so daß auch hieraus keine echte Kristallisation gelang.

Es wurde daher zunächst eine Arbeitsweise angewandt, bei welcher die letztlich einzudunstende Farbstofflösung frei von überschüssigem Oxydationsmittel, von Säure usw. zu erhalten war. Dabei wurde wie folgt verfahren:

Das Leukohydrochlorid XI wurde in einem Scheidetrichter in Methylenchlorid gelöst und nach Zusatz von 2 n Salzsäure unter portionsweiser Zugabe von Natriumnitritlösung kräftig geschüttelt. Die tief dunkelblaue Methylenchlorid-Phase wurde abgetrennt, mit Harnstofflösung und verdünnter Salzsäure gewaschen, danach filtriert und eingedunstet. Es wurde so ein kupferglänzender, krustiger, aber nicht eigentlich kristalliner Rückstand erhalten.

Die Elementaranalyse dieses Produktes stimmte aber mit dem erwarteten Methen nicht überein; auch zeigten wiederholte Ansätze untereinander keine befriedigende Übereinstimmung der Analysenwerte. Papierchromatographisch wurde in verschiedenen Lösungsmittelsystemen stets nur ein blauer Farbfleck erhalten. Ansätze mit überschüssigem Nitrit ergaben noch ungünstigere Analysenwerte und Farbstoffprodukte mit abgeflachten Absorptionskurven. Reduzierung des Oxydationsmittels auf unter 0,75 Mol Nitrit / 1 Mol XI führte zu unvollständigen Umsetzungen und damit zu niedrigeren Extinktionswerten des Farbstoffrückstandes.

Es wurden daher andere Arbeitsverfahren gesucht mit dem Ziel, unter allen Umständen zu einem kristallinen Produkt zu kommen: In Vorversuchen war festgestellt worden, daß der Farbstoff aus wässriger Lösung durch NaCl ausgesalzen werden kann. Zwar wurden hierbei zunächst amorphe Niederschläge erhalten, es ergab sich daraus aber doch die Möglichkeit einer Abscheidung des Farbstoffs aus Mischungen von Wasser und wassermischbaren Lösungsmitteln. Dies wiederum ermöglichte es, die Oxydation in solchen Lösungsmitteln durchzuführen. Durch Einrühren derartiger Reaktionsgemische in heiße, verdünnte NaCl-Lösungen und sehr langsames Erkaltenlassen gelang es endlich, den Farbstoff aus Lösung kristallisiert zu erhalten. Nach einer größeren Zahl von Variationen führte schließlich die folgende Arbeitsweise zum Ziel:

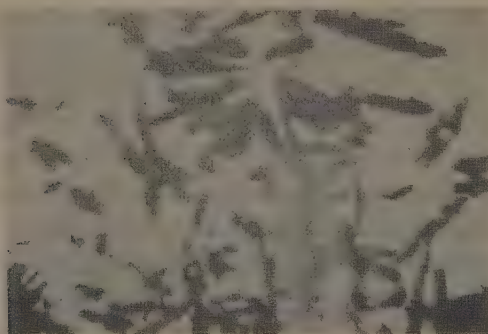
1,72 g der Leukoverbindung XI wurden in einer Mischung von 30 ml Essigester, 10 ml Eisessig und 15 ml Äthanol gelöst und mit 12 ml etwa 3 n Salzsäure versetzt. Zu dieser Mischung wurden 210 mg Natriumnitrit (gelöst in 21 ml Wasser) unter ständigem, lebhaftem Rühren sehr langsam eingetropft. Danach wurde der Ansatz noch 20 min. bei 37° gehalten. Nun wurde diese Mischung in 1000 ml einer auf 80° erwärmten 2%igen Lösung von NaCl in 0,05 n Salzsäure unter heftigem Rühren eingetragen. Durch Wärmeisolierung wurde für eine langsame Abkühlung gesorgt. Nach 20stündigem Stehen hatten sich bronzeglänzende Kristalle an der Wand und am Boden des Glases abgesetzt. Diese wurden auf einer Glasfritte abgesaugt, reichlich mit kaltem Wasser gewaschen und bei 50° im Vakuum getrocknet. (Abb.)

Schmelzpunkt (Kofler) : 198 - 201°.

Die Analyse dieses Produkts ergab sehr gute Übereinstimmung mit den berechneten Werten für das erwartete Methen + 1 H₂O.

	berechnet für	gefunden:
	$C_{27} H_{26} N_3 Cl + 1 H_2O$	
C	72,8	72,5
H	6,3	6,1
N	9,4	9,5
Cl	8,0	8,0

Abb. 28: Kristalle des blauen Farbstoffs XII



Kennzeichnung der Eigenschaften.

Die nach dem oben genannten Verfahren erhaltenen Kristalle lösen sich in Lösungsmitteln mit tiefblauer Farbe. Das Absorptionsspektrum dieser Lösungen entspricht vollkommen demjenigen der früher erhaltenen "Blaukomponente". (Vergl. hierzu die Abb. 15, a' und 30.)

Analog den beim violettroten Farbstoff durchgeführten Versuchen wurde auch hier der Einfluß des Säuregehalts auf die Farbintensität (Abb. 29) und auf die Gestalt des Absorptionsspektrums (Abb. 30) untersucht.

Abb. 29: Blauer Farbstoff (XII) / Abhängigkeit der Farbintensität von der Säurekonzentration im Lösungsgemisch.

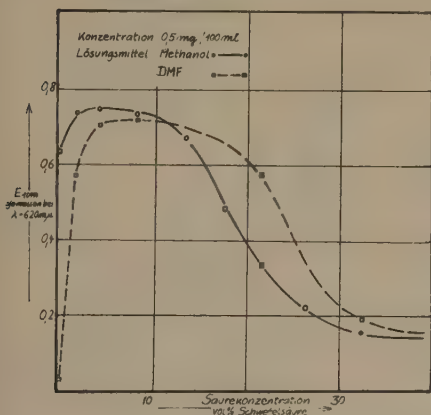
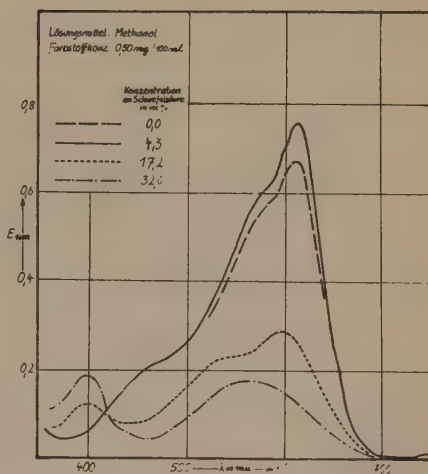


Abb. 30: Blauer Farbstoff (XII) / Änderung des Absorptionsspektrums mit zunehmender Säurekonzentration.

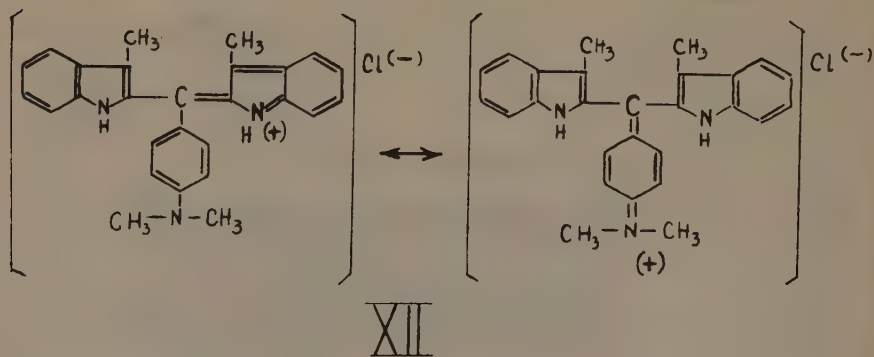


Aus den Darstellungen der Abb. 29 und 30 ergeben sich die folgenden Aussagen über die Eigenschaften des blauen Farbstoffs:

- 34) Das Maximum an Farbinintensität liegt beim blauen Farbstoff XII bei einer deutlich niedrigeren H-Ionen Konzentration als beim violettroten Farbstoff X. Im Übrigen geht auch hier in reinen Lösungsmitteln die Farbinintensität infolge Solvolyse, in stark saurer Lösung durch Aufnahme zusätzlicher Ladungen, zurück. (In geringerem Maße kommt es unter dem Einfluß starker Säure auch zu einer irreversiblen chemischen Umwandlung.)

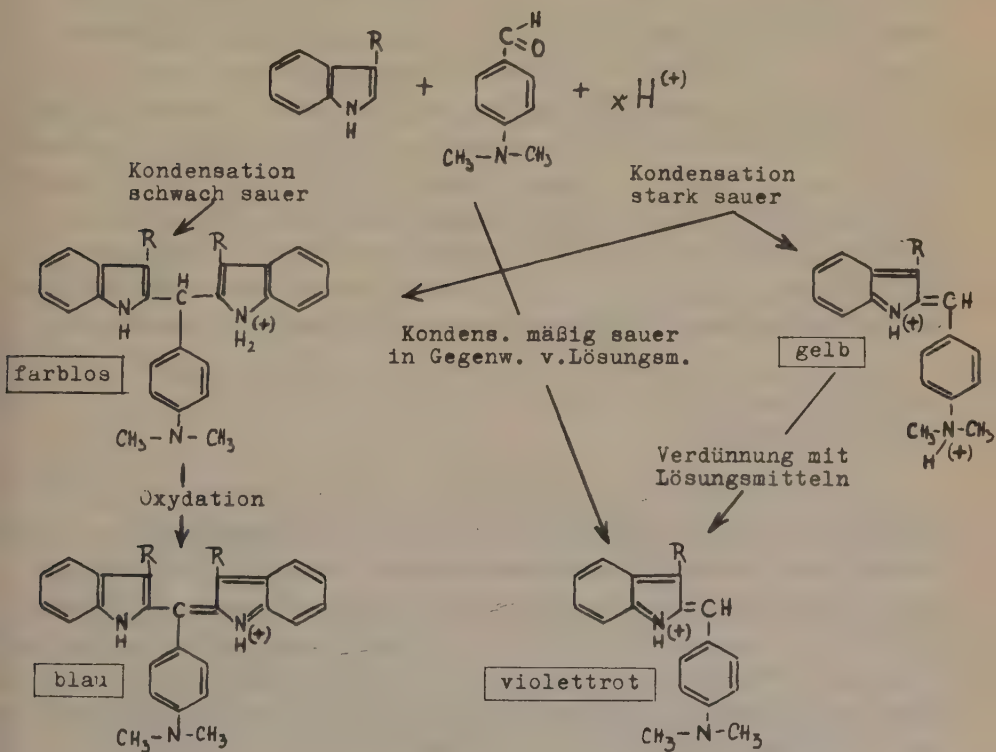
Als Beitrag für die Sicherung der Konstitution des Farbstoffes wurde noch sein Verhalten gegenüber Reduktionsmitteln geprüft: Durch Natriumdithionit (nicht durch Bisulfit oder Ascorbinsäure) gelang es in etwa 1 n schwefelsaurer Lösung den Farbstoff zu entfärben. Das von einer solchen reduzierten Farbstofflösung aufgenommene UV-Spektrum stimmte völlig mit demjenigen der Leukoverbindung XI überein. Durch Zusatz von überschüssigem Nitrit konnte wiederum die blaue Farbe zurückgehalten werden.

Die Formulierung des Farbstoffs als α, α' -Diskatyl-(p-dimethylaminophenyl)-methen-Kation (XII) darf nach dem Gesagten als gesichert gelten.



Reaktionsschema.

Im Anschluß an die chemische Kennzeichnung der einzelnen Reaktionsprodukte war es nun möglich, den oben nur nach dem Erscheinungsbild beschriebenen Reaktionsablauf nunmehr auch als Formelbild aufzustellen.



Damit soll die Untersuchung über das Reaktionsgeschehen der Ehrlich-Urk'schen Farbreaktion, speziell des 3-Methylindols, vorläufig abgeschlossen sein. Weitere Beiträge über den Reaktionsmechanismus sowie über die Anwendbarkeit dieser Modellreaktion auf andere Indolverbindungen sollen die folgenden Untersuchungen erbringen.

Untersuchungen über die Farbreaktion
an anderen β -substituierten Indolen.

Nachdem im ersten Teil der Untersuchungen die eigentliche van U r k ' sche Farbreaktion auf den Bereich der β -substituierten, α -freien Indole abgegrenzt worden war (vergl. Befund Nr. (2)), und nachdem am 3-Methylindol als Modellsubstanz der Reaktionsablauf unter verschiedenen Arbeitsbedingungen klargestellt werden konnte, war nunmehr von hier aus der Anschluß an die Reaktion anderer — β -substituierter — Indolverbindungen aufzunehmen. Unter Nr. (3) war aus dem Vergleich der Farbreaktion von 3-Methylindol einerseits und DHLs andererseits auf einen wesentlichen Einfluß des Substituenten in der β -Stellung geschlossen worden. Die im folgenden Abschnitt dargestellten Versuche dienten dem Studium dieses Faktors. Hauptsächliches Ziel dieser Untersuchungen war es dabei, auch von dieser Seite her Beiträge für die Kenntnis des Reaktionsmechanismus zu liefern. In zweiter Linie sollten die Versuchsergebnisse Richtlinien für die praktische Analytik biologisch interessanter Indole erbringen.

Die Standardmethoden:

Aufgrund der oben mitgeteilten Studien über den Reaktionsverlauf unter verschiedenen Arbeitsbedingungen (Säurenstärke, Verdünnungseffekt, Oxydationsmodus) wurde eine Anzahl von Standardmethoden festgelegt. Um absolute Vergleichsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Verbindungen zu schaffen, wurden nach diesen konstanten Verfahren alle nachfolgend genannten Indolkörper einheitlich geprüft. Desgleichen wurden in jedem Falle gleiche molare Mengen eingesetzt ($2 \cdot 10^{-7}$ Mol), und es wurden die Reaktionsgemische für die spektralphotometrische Messung stets auf das gleiche Endvolumen (5,0 ml) gebracht.

Die einzelnen Ansätze setzten sich wie folgt zusammen: ("L" bedeutet dabei jeweils eine 10^{-3} molare Lösung der betreffenden Indolverbindung.)

I Ansatz wie bei der üblichen van U r k - Reaktion, jedoch mit einem eisenfreien Reagenz (n.o.R., s.S. 27):

0,20 ml L + 1,5 ml H₂O + 3,3 ml n.o.R.; Messung nach 15 min.

II van U r k - Reaktion in üblicher Ausführungsform:

0,20 ml L + 1,5 ml H₂O + 3,3 ml van U r k s Reagenz; Messung nach 15 min.

III Ansatz mit primär hoher Säurekonzentration ohne Oxydationsmittel; nachfolgende Verdünnung mit DMF. Optimale Bedingung zur bevorzugten Ausbildung des violettroten Farbstoffs:

0,20 ml L + 2,8 ml n.o.R. — 3 min. stehen lassen —, dann Zusatz von 2,0 ml DMF unter Kühlung; Messung nach weiteren 3 min.

IV Oxydation mit Nitrit in verdünnter Lösung. Optimale Bedingung zur bevorzugten Ausbildung des blauen Farbstoffs:

0,20 ml L + 0,8 ml H₂O + 1,0 ml n.o.R. — 5 min. stehen lassen — dann Zusatz von 2,9 ml DMF unter Kühlung, dann Zusatz von 0,10 ml einer 0,02 n Natriumnitritlösung; Messung nach 15 min.

IVa Ansatz wie IV, jedoch mit höherer primärer Säurekonzentration:

0,20 ml L + 0,5 ml H₂O + 1,4 ml n.o.R. — 5 min. stehen lassen — + 2,8 ml DMF + 0,10 ml 0,02 n Natriumnitrit; Messung nach 15 min.

IVb Ansatz wie IV, jedoch mit noch höherer primärer Säurekonzentration:

0,20 ml L + 2,8 ml n.o.R. — 5 min. stehen lassen — dann Zusatz von 1,9 ml DMF (Kühlung) + 0,10 ml 0,02 n Natriumnitrit.

V Übliche van U r k - Reaktion, jedoch mit nachfolgendem Verdünnungseffekt zur Differenzierung des Spektrums:

0,20 ml L + 0,8 ml H₂O + 2,0 ml van U r k s Reagenz — 15 min. stehen lassen — dann Zusatz von 2,0 ml DMF unter Kühlung.

Va Verdünnte van U r k - Reaktion wie V, jedoch letztlich mit Nitrit nachoxydiert:

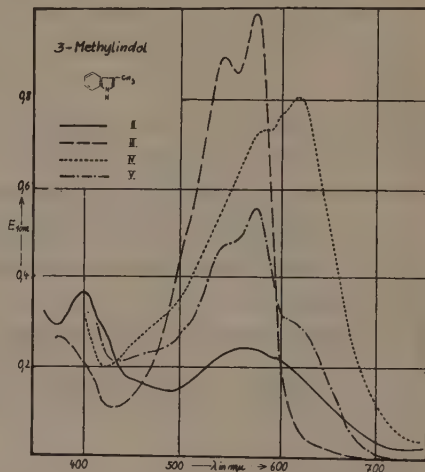
0,20 ml L + 0,8 ml H₂O + 2,0 ml van U r k s Reagenz — 15 min. stehen lassen — dann Zusatz von 1,9 ml DMF unter Kühlung, dann Zusatz von 0,10 ml 0,02 n Natriumnitritlösung; Messung nach weiteren 10 min.

Prüfung der einzelnen Substanzen.

Alkylsubstitution.

3-Methylindol, das im vorhergehenden Teil der Arbeit als Modells substanz gedient hatte, wurde auch hier als Vergleich für die folgende Reihe von Indol-derivaten vorangestellt:

Die Arbeitsweisen I und II, d. h. mit stark sauren Reaktionsendlösungen, ergeben nur relativ schwache Färbungen mit wenig ausgeprägten Absorptionsspektren. Methode III ergibt den reinen violettroten Farbstoff, IV überwiegend den blauen. Die "Auflösung" der van U r k - Reaktion durch nachfolgendes Verdünnen (V) zeigt die Beteiligung beider Komponenten an der Reaktion, wobei aber violettrot deutlich überwiegt.

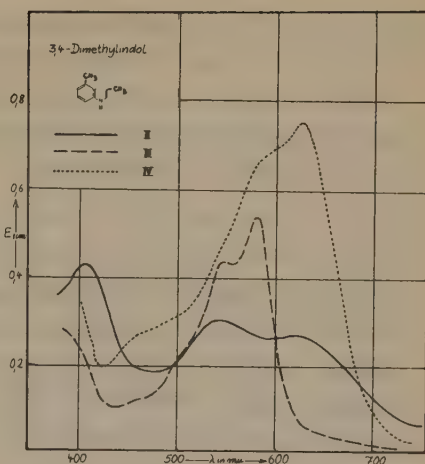


3-Isopropylindol verhält sich ähnlich wie 3-Methylindol: Die übliche van U r k - Reaktion II ist aber noch schwächer ausgeprägt als beim Skatol. Auch hier gibt Methode IV ganz überwiegend den blauen, Methode III den reinen violettroten Farbstoff. III ergibt auch die größte Farbintensität.

1,3-Dimethylindol gibt nach I, II, III und V nur relativ schwache Färbungen;^{x)} IV ergibt eine mäßig kräftige violettblaue Färbung, jedoch mit wenig scharf ausgeprägter Absorptionsbande.

x) Dies steht in Übereinstimmung mit den Befunden von Troxler und Hofmann⁽⁴⁸⁾ über eine Abschwächung der Farbreaktion bei Alkylierung der LS in 1-Stellung.

3,4-Dimethylindol neigt — im Vergleich zum Skatol — mehr zur Bildung des blauen Farbstoffs: IV ergibt eine beträchtlich größere Farbintensität als III. Auch die übliche van U r k - Arbeitsweise II zeigt schon einen deutlichen Blau-Anteil.



3,5-Dimethylindol zeichnet sich gegenüber dem Skatol durch besonders intensive Färbungen aus: III und V erreichen unter den entsprechenden Bedingungen Extinktionen über 1,0. Violettrot ist dabei deutlich bevorzugt.

Arylsubstitution.

3-Phenylindol gibt unter den Bedingungen I - Va und innerhalb der oben genannten Reaktionszeitspannen fast keine Farbreaktionen. (Nur nach längerem Stehen und bei Anwendung höherer Konzentrationen kommt es bei den stark sauren und mit Nitrit oxydierten Methoden IVa und IVb zu schwachen bis mäßig kräftigen violettblauen Färbungen.)

1-Methyl-3-Phenylindol zeigt gleichfalls nur nach IVa und IVb schwache bis mäßig ausgeprägte violettblaue Färbungen, hier aber schon in der üblichen Konzentration. Die Spektren sind niedrig, breit und wenig ausgeprägt.

Funktionelle Gruppen in β -Stellung direkt am Pyrrolkern.

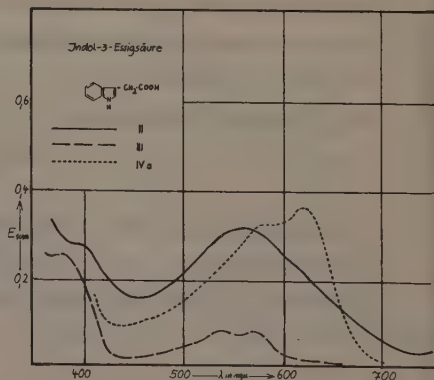
Indol-3-aldehyd zeigt keine Farbreaktion unter den Bedingungen der Standardmethoden. Hierauf haben bereits v. Dobeneck und Prietzel hingewiesen.

Indol-3-carbonsäure verhält sich gleichfalls negativ. Nach längerer Einwirkung starker Säure und nachfolgendem Verdünnen erhält man eine schwache bis mäßige Rotfärbung mit dem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 563 \text{ m}\mu$, die demjenigen des Indols entspricht. Es tritt hierbei also eine allmähliche Decarboxylierung zum Indol ein.

Funktionelle Gruppen in der β -ständigen Seitenkette.

Indol-3-essigsäure beansprucht hinsichtlich ihrer Farbreaktion mit van Urk's Reagenz einiges Interesse: Pöhm spricht von einer weitgehenden Ähnlichkeit der Absorptionskurven von β -Indolylessigsäure und Dihydrolysergsäure bei der van Urk'schen Farbreaktion. R a s s b a c h (49) überprüft eine Beeinflussung der kolorimetrischen Alkaloidbestimmung in Claviceps-Mycelien durch die mögliche Anwesenheit von Heteroauxin. Er stellt fest, die erzielte Blaufärbung sei bei Indolylessigsäure größer als diejenige aus einer gleichen Gewichtsmenge Ergotamin. Für die vorliegende Betrachtung interessiert jedoch ausschließlich der Vergleich äquimolarer Mengen.

Hierbei zeigt Indol-3-essigsäure verhältnismäßig schwache Färbungen. Für das Zustandekommen bedarf es einer relativ hohen Säurenstärke und eines



oxydierenden Einflusses; daher sind die Reaktionen nach II und IVa besser ausgebildet. Die violettrote Form nach III tritt dagegen stark zurück. Sowohl in diesem letztgenannten Punkt, als überhaupt in quantitativer Hinsicht besteht also keine ausgesprochene Ähnlichkeit mit der DHLS (s. unten).

Indol-3-propionsäure bringt beim Vergleich mit der Indolylessigsäure einen interessanten Befund: Die Farbreaktionen, besonders die Blau-Reaktionen nach IV und IVa, zeigen eine erheblich größere Farbintensität bei der Verbindung mit der längeren Seitenkette:

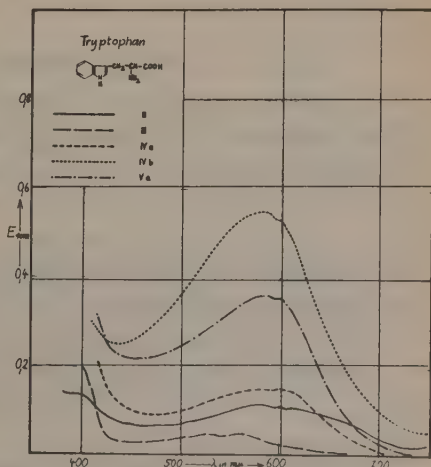
	maximale Extinktion	
	IV	IVa
Indolylpropionsäure	0,53	0,64
Indolylessigsäure	0,19	0,35

Auf diese Beobachtung wird weiter unten noch näher eingegangen.

Tryptophan = Indol-3-(α -aminopropionsäure) leitet von den Indolcarbonsäuren zu den Derivaten mit basischer Seitenkette über. Die Farbreaktionen des Tryptophans sind durch folgende Untersuchungsbefunde gekennzeichnet: II, also Original-van U r k gibt nur eine schwache Blaufärbung mit flacher Absorptionskurve; ähnlich der Ansatz V (d.h.

van U r k mit nachfolgender Verdünnung).

Methode III gibt den zu erwartenden violettroten Farbstoff nur sehr schwach. Die Ansätze der Gruppe IV (zur Erzielung der Blau-Reaktion) geben eine um so kräftigere Färbung, je stärker sauer der Ansatz ist: IV bleibt fast farblos, IVa ist schwach blau, IVb kräftig violettblau (vergl. hierzu auch S p i e s und C h a m b e r s ⁽⁵⁰⁾). Daß die Reaktion nicht nur starker Säure, sondern auch einer kräftigeren Oxydation bedarf, zeigt sich (bei den hier durchgeführten Standardbedingungen) darin, daß Va, also der



mit Nitrit nachoxydierte Ansatz, eine beträchtlich stärkere Färbung ergibt als V. Auffallend ist die weniger differenzierte Form der Absorptionskurven im Vergleich mit anderen Indolen. Dies macht einen etwas komplizierteren Reaktionsablauf wahrscheinlich.

Für die praktische Analytik ergibt sich aus den Befunden u. A. die Möglichkeit, andere Indole (z. B. Skatol, DHLS) in Gegenwart von Tryptophan nach Methode III fast fehlerfrei zu bestimmen.

Gramin = 3-Dimethylamino-methyl-indol gibt nach den beschriebenen Standardmethoden und in der hierbei angewandten Konzentration ($2 \cdot 10^{-7}$ Mol / 5 ml) praktisch keine Farbreaktion. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den Angaben von v. Euler und Erdtmann⁽⁵¹⁾. Wieland und Hsing⁽⁵²⁾ beobachteten nur eine schwache Farberscheinung. Von einer schwachen Farbreaktion mit Ehrlich's Reagenz sprechen auch Kühn und Stein⁽⁵³⁾. Diese Autoren⁽⁵¹⁻⁵³⁾ machen allerdings keine Angaben über die von ihnen gebrauchten Konzentrationen. v. Dobeneck und Prietzel sind der Auffassung, alle 3-substituierten Indole mit freier 2-Stellung müßten die Farbreaktion geben. Sie berichten daher über eine "starke Farbreaktion" bei Anwendung besonders energischer Bedingungen (1/2stündige Kondensation in konz. Salzsäure). Beim Nacharbeiten der v. Dobeneck'schen Vorschrift konnte bei Anwendung der hier benutzten Menge von $2 \cdot 10^{-7}$ Mol ($\approx 0,035$ mg) keine Farbreaktion erhalten werden. Erst bei Einsatz von 3 mg^{x} Gramin wurde eine deutliche Violettfärbung erhalten.

Diese z. T. widersprechenden Befunde können nur durch eine quantitative Betrachtungsweise richtig beurteilt werden: Gramin reagiert außerordentlich viel schwächer (ca. 100fach) als andere vergleichbare Indole. Eine Deutung dieser Tatsache wird weiter unten diskutiert.

1-Methylgramin gibt nach II und IV, schon in der niedrigen Konzentration, Färbungen, allerdings deutlich schwächere. Es zeigt jedenfalls eine etwas größere Reaktionsbereitschaft als Gramin (vergl. hierzu das Verhalten des 1-Methyl-3-phenylindols).

x) also entsprechend der von den genannten Autoren angegebenen Größenordnung von 1 - 5 mg.

Tryptamin = 3-(β -aminoäthyl)-indol verhält sich unter den verschiedenen Bedingungen der Standardmethoden ähnlich wie Tryptophan: IVb gibt die stärkste Farbentwicklung. Die Oxydation mit Fe^{III} erweist sich auch hier als unzureichend: II und V sind wesentlich schwächer ausgebildet als die mit Nitrit oxydierten Ansätze IVa, IVb und Va.

Dialkyl-tryptamin (geprüft wurde Dibutyl-tryptamin) zeigt weitgehend gleiches Verhalten wie Tryptamin, d.h. es werden nach II, III, IV und V schwächere, nach IVa, IVb und Va kräftige Farbreaktionen erhalten. Dies ist im Hinblick auf die schwache Reaktionsbereitschaft des Gramins besonders bemerkenswert (s.hierzu Besprechung dieser Ergebnisse S. 72).

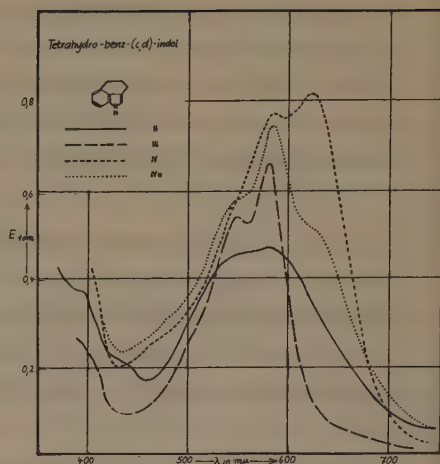
Serotonin = 5-Hydroxy-tryptamin zeigt gegenüber dem Tryptamin eine etwas abgeschwächte Reaktionsbereitschaft. Ein violetter Farbstoff nach Methode III wird nur schwach gebildet und ist wenig beständig. Die stärkste Färbung erhält man nach IVa. Der Farbton ist dabei violettblau und das Absorptionsspektrum breit und wenig ausgeprägt.

5-Hydroxy-tryptophan verhält sich ähnlich wie Tryptophan, doch ist auch hier die Reaktionsfähigkeit der Hydroxylverbindung deutlich abgeschwächt.

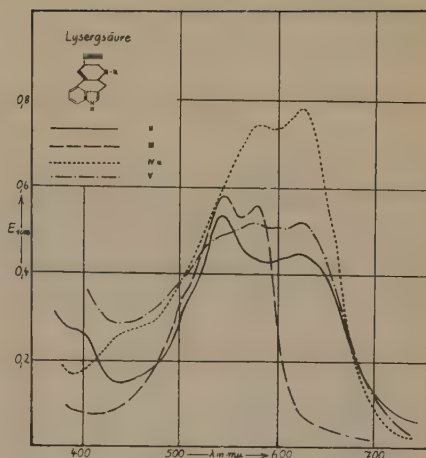
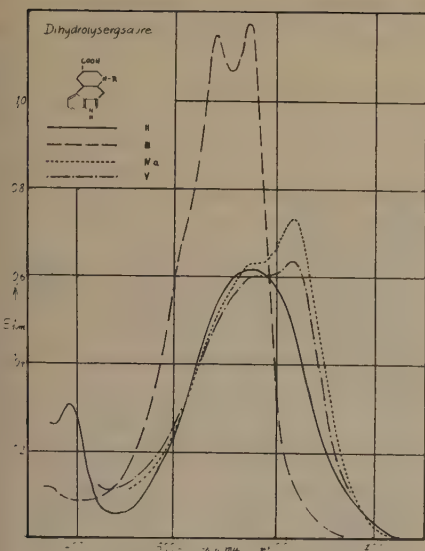
Kondensierte Systeme.

Tetrahydrobenz(c,d)-indol (abgekürzt: THBI) war als Zwischenglied zwischen den einfachen β -alkylsubstituierten Indolen einerseits und der Lysergsäure (LS) bzw. Dihydrolysergsäure (DHLS) andererseits für die hier zu behandelnde Fragestellung von besonderem Interesse. Tatsächlich stellt THBI auch hinsichtlich der Farbreaktion einen deutlichen Übergang zwischen 3-Methylindol und DHLS dar. Bei Durchführung der Standardmethoden fällt gegenüber dem Skatol die leichtere Oxydierbarkeit auf: I, d.h. der Ansatz mit der eisenfreien, stark sauren Reagenzlösung, gibt eine grünlich-blaue Färbung nach 15 min.

langem Stehen an der Luft. II erbringt eine kräftige violettblaue Färbung. Diese ist stärker als beim Skatol, aber schwächer als bei der DHLS. Der violettrote Farbstoff nach III wird, ähnlich wie beim 3-Methylindol kräftig ausgebildet und ist auch bei den Reaktionsansätzen mit Oxydationsmittel beteiligt, besonders bei solchen mit relativ starker Säure (vergl. IV und IVa).



Dihydrolysergsäure und Lysergsäure nehmen für die hier verfolgte Betrachtungsweise eine zentrale Stellung ein: LS ist der eigentlich wirksame Indolkörper bei der van U r k ' schen Farbreaktion der Mutterkornalkaloide. Ein Vergleich der Absorptionskurven der Farbreaktionen von LS und DHLS (nach den Standardmethoden) mit denjenigen der einfachen β -substituierten Indolkörper, besonders mit der Modells substanz 3-Methylindol, zeigt eindeutig einen gleichartigen Reaktionsverlauf: Bei hoher primärer Säurekonzentration und nachfolgendem Verdünnen ohne Oxydationsmittel (=III) erhält man auch hier den reinen violettroten Farbstoff mit den Absorptionsmaxima bei 576 und 542 $m\mu$, besonders stark ausgeprägt bei der DHLS.

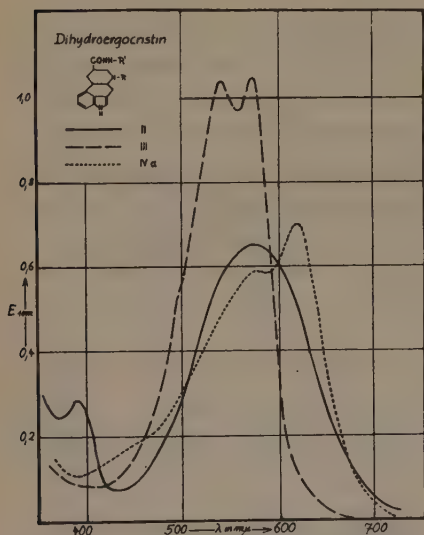


Nitritoxydation in den mit Lösungsmittel verdünnten Ansätzen ergibt auch hier ganz überwiegend den blauen Farbstoff. Die "klassische" Ausführungsform (II) zeigt zwischen DHLS und LS einen sehr deutlichen Unterschied: erstere ergibt eine scheinbar einheitliche Absorptionskurve, und erst ihre "Auflösung" durch nachträglichen Zusatz von Lösungsmittel zeigt, daß auch hierin der violettrote neben dem blauen Farbstoff enthalten ist. Bei der LS ist — infolge der Doppelbindung — die Absorptionsbande bei $542\text{ m}\mu$ verstärkt (s. III) und daher auch in der üblichen Ausführungsform II sichtbar.

Eine wichtige Eigenart beider Verbindungen liegt, wie oben erwähnt, darin, daß die Oxydation zum blauen Farbstoff sehr leicht, nämlich schon mit Fe^{III} nahezu vollständig erfolgt.

Mutterkornalkaloide, die sich von der LS ableiten, zeigen in ihren Farbreaktionen Übereinstimmung mit denjenigen der Lysergsäure. Hydrierte Alkaloide ergeben entsprechende Spektren wie DHLS. Als Beispiel werden hier die Absorptionskurven von Ergocristin und Dihydroergocristin nach den Standardverfahren aufgeführt. Verschiedene Alkaloide der LS-Gruppe wie Ergometrin, Ergotamin, Ergocristin usw. zeigen bei Anwendung äquimolarer Mengen praktisch völlige

Übereinstimmung. Die Amid- bzw. Peptidkomponente hat also keinen spezifischen Einfluß auf die Farbreaktion.



die zugleich in 3-Stellung einen Alkylrest tragen. (Ergänzung des Befundes Nr. (2)).

- (36) Zusätzliche Alkylsubstitution in 5-Stellung verstärkt die Reaktionsfähigkeit sehr deutlich.
- (37) Funktionelle Gruppen in 3-Stellung direkt am Pyrrolring verhindern die Reaktion, ebenso Phenyl in 3-Stellung.
- (38) Funktionelle Gruppen in der β -ständigen Seitenkette hemmen die Reaktion, und zwar umso mehr, je näher sie am Pyrrolkern stehen. Amino hemmt stärker als Carboxyl. Die violettrote Komponente der Farbreaktion (Typ X) wird stärker unterdrückt als die blaue Komponente.
- (39) Hydroxyl in 5-Stellung wirkt gleichfalls etwas hemmend auf die Reaktionsfähigkeit der α -Stellung.
- (40) Alkyl (Methyl) in 1-Stellung hat — aber nur bei gleichzeitig hemmendem Einfluß von Substituenten in 3-Stellung — eine schwach fördernde Wirkung.
- (41) In der Reihe 3-Methylindol $\rightarrow$ 3,4-Dimethylindol $\rightarrow$ THBI $\rightarrow$ DHLS (bzw. LS), also mit zunehmendem Aufbau des Ergolingerüsts, tritt eine zunehmend leichtere Oxydierbarkeit der Bis-indolyl-methan-Leukoverbindung (Typ XI) zum entsprechenden blauen Farbstoff auf.

Besprechung dieser Ergebnisse:

Eine Deutung der im Vorhergehenden zusammengestellten Befunde mußte zur Klärung des ganzen Reaktionsgeschehens der van U r k ' schen Farb-reaktion Wesentliches beitragen:

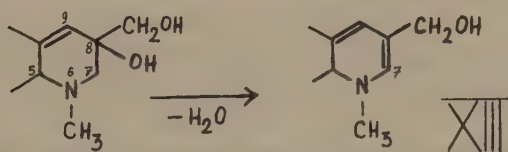
So kann der aktivierende bzw. hemmende Einfluß der Substituenten in 3-Stellung als weiterer Beweis für den Angriff der Kondensation in 2-Stellung gewertet werden; ebenso der farbverstärkende Effekt der Alkylsubstitution in 5-Stellung. Die F e a r o n ' sche Auffassung einer Kondensation am Benzol-ring (13) darf damit als endgültig widerlegt gelten.

Zur Erklärung dieser aktivierenden und hemmenden Einflüsse ist ein induktiver Effekt dieser Substituenten anzunehmen: Alkylgruppen in o- und p-Stellung (im vorliegenden Falle in 3- und 5-Stellung) bewirken eine Abgabe von Elektronen, einen "Elektronendruck" in das System hinein (= + I-Effekt) und damit eine Aktivierung der α -Stellung. Umgekehrt üben Amino-, Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen sowie auch der Phenylrest einen "Elektronensog" (= - I-Effekt) aus und deaktivieren diese Position. Eine ähnliche Wirkungsweise (- I-Effekt) wie beim Gramin von der 3-Stellung aus ist wohl auch für die von Troxler und Hofmann⁽⁵⁴⁾ beschriebene Hemmung durch Dialkylaminomethylierung der LS in 1-Stellung denkbar. Schließlich ist auch die Abnahme des hemmenden (-I)-Effekts durch zwischengeschaltete CH₂-Glieder hieraus zu erklären. (Vergl. hierzu die Reihe: Indol-3-Carbonsäure → 3-Essigsäure → 3-Propionsäure).

Den kondensierten Systemen des THBI und des Ergolingerüsts ist gleichfalls ein +I-Effekt zuzuschreiben.

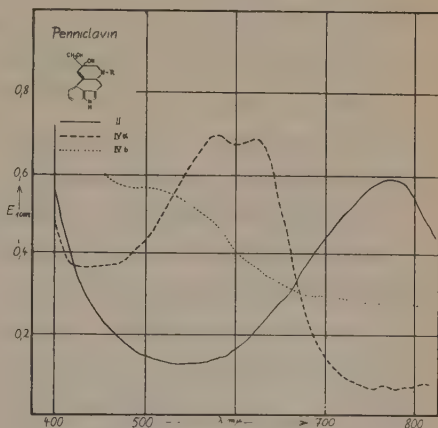
Anhang:

Penniclavins: Im Gegensatz zu anderen Clavinen ergeben diejenigen mit einer tertiären Hydroxylgruppe am Ring D keine blaue, sondern eine grüne Farb-reaktion. Klavehn und Rochelmeyer ⁽⁵⁴⁾ nehmen hierbei eine Was-serabspaltung und damit die Bildung eines Systems konjugierter Doppelbindungen an, demzufolge die Absorption bathochrom verschoben wird.



Diese Erscheinung wurde im Rahmen der vorliegenden Reihe am Beispiel des Penniclavins ^{x)} spektrophotometrisch untersucht:

Die Methoden I und II ergeben gelb-stichig-grüne Farbreaktionen mit einem Absorptionsschwergewicht um 750 m μ . (Bei II wird im Augenblick des Reagenz-zusatzes eine schwache bis deutliche Blaufärbung beobachtet, die dann aber schnell der Grünfärbung weicht.) Die Färbungen aus I und II, also mit und ohne Beteiligung von Fe^{III} , sind quali-tativ praktisch gleich, quantitativ ist II wenig stärker als I.



x) Um besser ausgeprägte Absorptionsbanden zu erhalten, wurden hier jeweils $4 \cdot 10^{-7}$ Mol angewandt.

Auch der Ansatz III (ohne Oxydationsmittel) ergibt zunächst, d.h. bei Zusatz der schwefelsauren p-DAB-Lösung, eine kräftige Grünfärbung. Diese wird beim nachfolgenden Verdünnen mit Lösungsmittel schwächer (olivgrün); die Absorptionskurve wird abgeflacht. Auch die Ansätze mit Nitritoxydation in verdünnter Lösung zeigen die Sonderstellung dieses Verbindungstyps sehr deutlich: Der primär stark saure Ansatz IVb ist vor Zusatz des Oxydationsmittels grün (wie III) und schlägt nach Zugabe der Nitritlösung in ein unreines Violettbraun um. Dagegen gelingt es in Reaktionsansätzen mit primär niedriger Säurekonzentration wie IV und besonders IV α (s. Fußnote^x) die Grünreaktion weitgehend zu unterdrücken und statt dessen eine echte violettblaue van U r k - Reaktion mit den Absorptionsmaxima um 575 und 625 m μ zu erzielen.

Die Auswertung dieser Befunde regt zu den folgenden Betrachtungen an: Die Tatsache, daß es nur in stark saurer Lösung zu einer Grünfärbung kommt, spricht für die oben genannte Deutung einer Wasserabspaltung im Ring D. In schwach sauren Ansätzen liegt die ursprüngliche Konfiguration und damit die Voraussetzung für eine "normale" Blaureaktion vor. Ob die Grünfärbung aber nur eine bathochrome Verschiebung der van U r k - Reaktion darstellt, kann aus dem Dargestellten nicht mit Sicherheit geschlossen werden. Die unähnliche Gestalt der Absorptionskurven, sowie die Ausbildung der Grünfärbung auch ohne Teilnahme eines Oxydationsmittels, legen den Gedanken nahe, daß die Grünreaktion vielleicht anderer Natur ist, d.h., daß sie möglicherweise einen anderen Angriffspunkt als die α -Stellung des Indols hat. In erster Linie ist dabei an die durch die Wasserabspaltung aktivierte 7-Stellung (Formel XII) zu denken. Die Klärung dieser Frage muß jedoch späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

x) IV α : 0,40 ml L + 1,3 ml H₂O + 0,8 ml n. o. R₄ + 2,4 ml DMF + 0,1 ml 0,02 n NaNO₂.

Beurteilung der van U r k ' schen Farbreaktion
hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für die quantitative
Bestimmung der Mutterkornalkaloide.

Der in den vorhergehenden Untersuchungen aufgezeigte uneinheitliche und gegen verschiedenartige Einflüsse empfindliche Verlauf der van U r k ' schen Reaktion gibt Veranlassung, die Farbreaktion abschließend auch auf ihre praktisch-analytische Brauchbarkeit hin zu beurteilen.

Seit der ersten Mitteilung von M. I. S m i t h ⁽¹⁶⁾ über eine quantitative Auswertung der van U r k ' schen Reaktion wurden in ständiger Folge neue Untersuchungen publiziert, die sich mit der Abänderung der Reaktionstechnik zum Zweck einer quantitativen Bestimmung der Mutterkornalkaloide befassen. Der Grund für diese immer wieder vorgelegten Variationen liegt in der starken Abhängigkeit des Reaktionsverlaufs von einer Reihe von Faktoren:

So wurde insbesondere die Säurekonzentration vielfach variiert. Auch in neueren Arbeiten (z. B. V o i g t ⁽³³⁾, G y e n e s ⁽³⁷⁾) bestehen noch unterschiedliche Ansichten über eine optimale Säurenstärke der Reagenzlösung. Die Bedeutung der Säurekonzentration für den gesamten Reaktionsablauf wurde auch in der vorliegenden Arbeit wiederholt dargestellt.

Über die verschiedenen Auffassungen und Methoden der Oxydationsphase wurde schon in der Einleitung berichtet (s. S. 8). Besonders zahlreich sind die Vorschläge über die anzuwendende Menge des Oxydationsmittels (Lit. s. bei V o i g t). Die Bestrebungen gehen in diesem Punkt dahin, den schmalen Bereich zwischen oxydativer Bildung des Farbstoffs einerseits und Abbau der Farbintensität durch überschüssiges Oxydationsmittel andererseits zu treffen. Auf die Möglichkeit, diesen "Engpaß" durch Pufferung mit Lösungsmitteln breiter zu gestalten, wurde im experimentellen Teil hingewiesen.

Umfangreiche Untersuchungen liegen auch über den Einfluß des Lichts bzw. künstlicher UV-Bestrahlung vor ^(16, 30, 33, 41, 56), wobei gleichfalls unterschiedliche Ansichten vertreten werden.

An weiteren Faktoren wurde der Gehalt an Lösungsmitteln ^(16, 37), die Temperatur ⁽³⁷⁾, die Reinheit des eingesetzten Aldehyds ⁽³⁷⁾, das Alter der Reagenzlösung ^(57, 58, 59) sowie Art und Haltbarkeit von Standard-

lösungen (44, 58, 59, 60, 61) untersucht oder unterschiedlich vorgeschrieben.

Nicht immer wurde dabei beachtet, daß es unzureichend ist, nur jeweils einen Faktor auf optimale Wirksamkeit einzustellen, denn vielfach bestehen Wechselwirkungen zwischen diesen einzelnen Faktoren: So bedürfen schwach saure Ansätze eines höheren Gehalts an Oxydationsmittel als stark saure; Belichtung und Oxydationsmittel wirken etwa gleichsinnig und können sich gegenseitig ergänzen ⁽³⁰⁾ oder über das Optimum hinaus addieren ⁽³³⁾, so daß es sekundär zu einer teilweisen Zerstörung des Farbstoffs kommt.

In den hier vorliegenden Untersuchungen wurde schließlich die wechselnde Teilnahme der gelben, violettroten und blauen Reaktionskomponente am Zustandekommen der Färbung, ihre Bildungsgeschwindigkeit und Stabilität sowie die hiermit zusammenhängende Veränderung des Absorptionsspektrums gezeigt.

Die Schwierigkeit, alle diese Einflüsse im Sinne eines optimalen Ablaufs zu steuern, hat verschiedentlich dazu geführt, die Farbreaktion zu verlassen und die Bestimmung der Alkaloide durch Messung ihrer UV-Absorption ^(37, 62, 63, 64) oder durch azidimetrische Titration in wasserfreiem Medium durchzuführen ^(37, 61, 65). Eine solche Entscheidung für oder wider die Farbreaktion kann nicht allgemein getroffen werden, sondern wird sich nach den jeweiligen Gegebenheiten richten:

Die Frage einer azidimetrischen Titration kann in der vorliegenden Betrachtung außer Acht gelassen werden: Dem Vorzug eines stöchiometrischen Reaktionsablaufs steht der — auch für Mikromethoden — erforderliche Substanzbedarf entgegen, der mit photometrischen Methoden nicht konkurrieren kann. Der Anwendungsbereich liegt daher in erster Linie bei der Gehaltsbestimmung reiner Alkaloide (Österr. Arzneibuch 9. Ausg., U. S. P. XVI).

Die Messung der Absorption im UV-Bereich steht der kolorimetrischen Bestimmung an Empfindlichkeit nicht nach. Ihr wesentlicher Vorzug ist, daß sie eine unmittelbare, absolute Meßgröße der zu bestimmenden Substanz darstellt. Dagegen ist ihre Spezifität gering. Um zuverlässige Werte zu liefern, muß der Wirkstoff in hoher Reinheit, d. h. absolut frei von UV-absorbierenden Begleit-
substanzen, vorliegen. Diese Forderung ist bei der Aufarbeitung von Drogen,

Myzelien oder Kulturflüssigkeiten nicht immer zu verwirklichen und zu kontrollieren.

Die van U r k ' sche Farbreaktion verhält sich in den genannten Punkten nahezu umgekehrt: Ihre Spezifität ist im Vergleich zur UV-Absorption wesentlich höher. β -Indolylessigsäure und Tryptophan, die bei biologischem Material als Störstoffe in Betracht kommen, sind von den Alkaloiden relativ leicht abzutrennen. Andererseits stellen die aus der van U r k ' schen Reaktion ermittelten "Blauwerte" keine absolute Meßgröße dar: Die Reaktion verläuft niemals streng quantitativ und, wie hier gezeigt wurde, auch nicht streng einheitlich. Bei der starken Beeinflußbarkeit der Farbreaktion durch die oben erwähnten Faktoren ist es nicht verwunderlich, daß auch nach wenig voneinander abweichenden Verfahren merkliche Unterschiede im Ausfall der Farbintensität erhalten werden. Darüber hinaus muß aber auch noch mit einer Beeinflussung durch solche Faktoren gerechnet werden, die bisher nicht eingehend untersucht worden sind (z. B. unterschiedliche Wärmetönung bei rascherem oder langsamerem Zusatz der Reagenzlösung oder beim Mischen größerer oder kleinerer Volumina).

Selbstverständlich richtet sich das Bestreben all der verschiedenen in der Literatur beschriebenen Abänderungsvorschläge dahin, den Reaktionsablauf optimal zu steuern. Unter dem Begriff "optimal" werden dabei im allgemeinen die folgenden Forderungen verstanden:

möglichst hohe Farbintensität,
möglichst hohe Farbstabilität,
möglichst gute Reproduzierbarkeit.

Die letztgenannte Forderung ist dabei die am schwierigsten zu erfüllende, da sich gerade auf diesen Punkt alle bekannten und unbekannten Einflüsse auswirken müssen. Es wird zweifellos möglich sein, durch peinlichste Einhaltung extrem genau definierter Reaktionsbedingungen zu relativ gut reproduzierbaren Extinktionswerten zu kommen. Dieser Weg ist jedoch nicht empfehlenswert, da er einen erheblichen Aufwand mit sich bringt und dabei immer noch die Fehlermöglichkeiten unbekannter -- und damit nicht konstant einstellbarer -- Einflüsse in sich birgt. Aus diesem Grund wird eine absolut-kolorimetrische Auswertung, wie sie von verschiedenen Autoren (41.42) und in neuerer Zeit im Österr. Arzneibuch, 9. Ausg. vorgeschrieben wird, nicht für glücklich gehalten.

Einfacher und zugleich sicherer ist vielmehr der Weg, zwar unter möglichst günstigen, aber nicht extrem genau definierten Bedingungen zu arbeiten und statt dessen jeweils auf einen Standard zu beziehen. Dieser muß allerdings in sehr genauer Übereinstimmung mit der Untersuchungsprobe behandelt werden. Geringe Unterschiede in der anzuwendenden Arbeitstechnik fallen bei diesem Prinzip nicht ins Gewicht.

Da für die Ausbildung der Farbreaktion ausschließlich der Lysergsäureanteil des Alkaloidmoleküls bestimmend ist, kann eine geeignete Standardsubstanz (unter Berücksichtigung des Molekulargewichts) für alle von der LS abgeleiteten Alkaloide benutzt werden. Die Verwendung einer amtlich festgelegten Standardsubstanz (Reference-Standard) ermöglicht dabei übereinstimmende Analyseergebnisse auch bei verschiedenen Untersuchungsstellen und zu verschiedenen Zeiten.

In dieser Form kann die van U r k ' sche Reaktion zur quantitativen Bestimmung der Mutterkornalkaloide als durchaus brauchbar und zuverlässig anerkannt werden, wofür nicht zuletzt auch ihre Aufnahme in die neuesten angelsächsischen Arzneibücher B. P. 1958 und U. S. P. XVI spricht.

Aus den Ergebnissen der hier mitgeteilten Untersuchungen wird die Methode IVa als Arbeitstechnik für die Bestimmung der LS-Alkaloide empfohlen. x)

x) S. hierzu die Ausführungen S. 64, 70 und die Absorptionskurven der Farbreaktion mit Ergocristin S. 70

ZUSAMMENFASSUNG

Die van U r k ' sche Reaktion wird unter dem Gesichtspunkt ihrer Zuordnung zur Gruppe der Indol-Aldehyd-Farbreaktionen untersucht. Dabei wird festgestellt: Eine eigentliche van U r k ' sche Reaktion, d.h. unter Beteiligung einer blauen Farbkomponente geben nur Indolverbindungen mit einer freien 2-Stellung, die ihrerseits durch Alkylgruppen in 3-Stellung aktiviert ist.

Am 3-Methylindol als Modells substanz für β -alkylsubstituierte Indole wird das Reaktionsgeschehen unter verschiedenen Arbeitsbedingungen eingehend untersucht:

Bei der Einwirkung von p-Dimethylaminobenzaldehyd auf β -alkylsubstituierte Indole in stark saurer Lösung erhält man ein Gemisch aus verschiedenen Reaktionsprodukten:

- 1.) Ein Kondensationsprodukt im Molverhältnis Indol/Aldehyd 1:1, entsprechend dem von T r e i b s und H e r r m a n n dargestellten [Indolyl-(α)] - [dimethylaminophenyl] -methen. Dieses liegt in stark saurer Lösung als zweifach (+)geladenes gelbes Kation, in schwächer saurer Lösung, vornehmlich in Gegenwart von Lösungsmitteln, als einfach (+)geladenes violettrotes Farbstoff-Kation vor.
- 2.) Ein farbloses Kondensationsprodukt im Molverhältnis Indol/Aldehyd 2:1. Dieses entspricht einem α , α' -Diskatyl-(dimethylaminophenyl)-methan.
- 3.) Die farblose Diindolylmethan-Verbindung wird durch geeignete Oxydationsmittel in einen blauen Farbstoff übergeführt. Dieser Farbstoff, dessen Konstitution in der Literatur durch Analogieschlüsse als α , α' -Diskatyl-(p-dimethylaminophenyl)-methen vorausgesagt worden ist, wird erstmals (als Chlorid) kristallin dargestellt und durch Analyse bestätigt.

Durch Anwendung geeigneter Arbeitsmethoden gelingt es, den Reaktionsablauf überwiegend nach der einen oder anderen Richtung hin zu lenken: Für die Erzeugung des violettroten Farbstoffs erweist sich eine Arbeitsweise besonders zweckmäßig, bei welcher primär durch starke Säure und durch Aldehydüberschuß eine fast ausschließliche 1:1 Kondensation erreicht und sekundär durch nachträg-

liches Verdünnen mit Lösungsmitteln die gelbe Form vollständig in den violett-roten Farbstoff übergeführt wird.

Die genannte Verdünnungstechnik ist auch für die Ausbildung des blauen Farbstoffs von Vorteil, da der in der Literatur vielfach als ungünstig beschriebene Überschuß an Oxydationsmittel in einer durch Lösungsmittel gepufferten Mischung sehr viel weniger schädlich ist.

Solche, nachträglich mit Lösungsmittel verdünnten Ansätze der Original-van U r k - Reaktion zeigen in gut differenzierten Absorptionskurven die Beteiligung der oben genannten Komponenten sehr deutlich.

Unter Anwendung verschiedener Standard-Arbeitsmethoden wird die wechselnde Beteiligung der gelben, violettroten und blauen Reaktionskomponente an einer Anzahl verschiedener Indolverbindungen einschließlich der Lysergsäure und der Mutterkornalkaloide demonstriert. Dabei tritt der Einfluß verschiedener Substituenten auf den Verlauf der Farbreaktion hervor.

Im Anhang zu dieser Reihe wird gezeigt, daß die grüne Farbreaktion, die bei der Einwirkung von van U r k s Reagenz auf Clavinalkaloide mit tertiärer Hydroxylgruppe eintritt, den hier behandelten übrigen Reaktionen unähnlich ist. Die Möglichkeit eines andersartigen Reaktionsverlaufs für diese Grünfärbung wird diskutiert.

In einer abschließenden Beurteilung über den praktisch-analytischen Gebrauchswert der van U r k ' schen Reaktion wird dargelegt, daß sich die Farb-reaktion wegen ihres nicht einheitlichen Verlaufs und wegen ihrer starken Beeinflußbarkeit durch zahlreiche Faktoren nicht für eine absolutkolorimetrische Auswertung eignet. Statt dessen wird die Auswertung durch Bezug auf eine parallel behandelte Standardsubstanz empfohlen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) H. W. van Urk, *Pharmac. Weekbl.* 66, 473 (1929).
- 2) W. A. Jakobs und L. C. Craig, *J. Biol. Chem.* 113, 767 (1936)
128, 715 (1939).
- 3) P. Tuzson, J. Tuzson und J. Bayer, *Acta Chim. Acad. Sci.*
Hung. 2, 15 (1951).
- 4) E. Fischer, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 19, 2988 (1886).
E. Fischer und P. Wagner, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 20, 815 (1887).
- 5) M. Pöhm, *Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.* 286, 509 (1953).
- 6) M. Wenzing, *Liebigs Ann. Chem.* 239, 239 (1887).
- 7) M. Freund und G. Lebach, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 36, 308 (1903)
38, 2640 (1905).
- 8) E. Chigi, *Gazz. chim. ital.* 63, 411 (1933).
- 9) V. Dostal, *Chem. Listy* 32, 13 (1938).
- 10) A. Etienne und R. Heymès, *Bull. Soc. Chim. France* 1948, 841.
- 11) H. v. Dobeneck und G. Maresch, *Hoppe-Seyler's Z. physiol.*
Chem. 289, 271 (1952).
- 12) A. P. Terentjew und L. A. Janowskaja, *Uspechi Chimii (Moskau)*
19, 215 (1950).
- 13) W. R. Fearon, *Biochem. J.* 14, 548 (1920).
- 14) H. Longet-Higgins und C. Coulson, *Trans. Farad. Soc.*
43, 8 (1947).
- 15) A. Hoschek, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 49, 2584 (1916).
- 16) M. I. Smith, *Publ. Health Rep.* 45, 1466 (1930).
- 17) M. Hadano, *J. Pharm. Soc. Japan* 48, 919 (1928).
- 18) F. Feist, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 35, 1647 (1902).
- 19) H. Fischer und H. Orth, *Die Chemie des Pyrrols, Bd. I*,
Leipzig 1934.
- 20) A. Treibs und E. Herrmann, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*
299, 168 (1955).
- 21) L. Knorr, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 19, 46 (1886).

- 22) E. Erdmann, Ber. dtsch. chem. Ges. 32, 1218 (1899).
- 23) P. Ehrlich, Medizinische Woche 1901, 151.
- 24) E. Rohde, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 44, 161 (1905).
- 25) F. A. Steensma, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
47, 25 (1906).
- 26) A. Gautier und C. Hervieux, C. r. Soc. de Biolog.
63, 610 (1907).
- 27) G. Denigès, C. r. Soc. de Biolog. 64, 295 und 689 (1908).
- 28) F. Blumenthal, Biochem. Z. 19, 521 (1909).
- 29) R. Freudweiler, Pharm. Acta Helvet. 7, 116 (1932).
- 30) N. L. Allport und T. T. Cocking, Quart. J. Pharmac.
Pharmacol. 5, 341 (1932).
- 31) E. Neuhoff, Dissertation Würzburg 1953.
- 32) W. Frieber, Centralbl. Bakter. und Parasitenk.
87, 254 (1922).
- 33) R. Voigt, Mikrochim. Acta 1959, 619.
- 34) L. Mattiolo, Z. wiss. Mikroskop. 2, 354 (1885).
- 35) V. Anger und G. Fischer, Mikrochim. Acta 1960, 592
- 36) E. Schulek und G. Vastagh, Dansk. Tidsskr. Farmaci
13, 101 (1939).
- 37) I. Gyenes und J. Bayer, Pharmazie 16, 211 (1961).
- 38) J. Molnar und A. Uskert, Magyar Kém. Folyóirat
56, 230 (1950).
- 39) K. Yamaguchi, T. Kawatani, T. Tabata, S. Fukushima und
M. Ito, J. Pharm. Soc. Japan 73, 268 (1953).
- 40) R. G. Smith, Journ. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 36, 321 (1947).
- 41) A. Silber und T. Schulze, Pharmazie 8, 675 (1953).
- 42) M. Pöhm, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges.
289, 324 (1956).
- 43) G. Gjerstad, J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 45, 428 (1956).
- 44) J. W. Strong und F. A. Maurina, J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed.
42, 414 (1953).

- 45) M. Pöhm, Mikrochim. Acta 1955, 1016.
- 46) H. Fischer und C. Nenicescu, Liebigs Ann. Chem.
439, 175 (1924).
- 47) H. v. Dobeneck und H. Prietzel, Hoppe-Seyler's Z.
physiolog. Chem. 299, 214 (1955).
- 48) F. Troxler und A. Hofmann, Helvet. Chim. Acta
40, 1721 (1957).
- 49) H. Rassbach, Dissertation Mainz, 1955.
- 50) J. R. Spies und D. C. Chambers, Analyt. Chemistry
20, 30 (1948).
- 51) H. v. Euler und H. Erdtmann, Liebigs Ann. Chem.
520, 1 (1935).
- 52) Th. Wieland und C. Y. Hsing, Liebigs Ann. Chem.
526, 190 (1936).
- 53) H. Kühn und O. Stein, Ber. dtsch. chem. Ges. 70, 567 (1937).
- 54) F. Troxler und A. Hofmann, Helvet. Chim. Acta
40, 1706 (1957).
- 55) M. Klavehn und H. Rochelmeyer, Dtsch. Apoth. Ztg.
101, 477 (1961).
- 56) J. Kolsek, Mikrochim. Acta 1956, 1662.
- 57) H. Lukesch und H. Pötter, Pharmazie 13, 364 (1958).
- 58) The British Pharmacopeia 1958.
- 59) Pharmacopeia of the United States XVI Ed., 1960.
- 60) S. A. Schou und V. G. Jensen, Dansk. Tidsskr. Farmaci
22, 1 (1960).
- 61) Oesterreichisches Arzneibuch 9. Ausgabe, 1960.
- 62) A. Harmsma, Pharm. Weekbl. 65, 1114 (1928).
- 63) W. A. Jacobs und L. C. Craig, Science 83, 166 (1936).
- 64) A. L. Kapoor, H. Schumacher und J. Büchi, Pharmac. Acta
Helvet. 32, 411 (1957).
- 65) L. Safarik und W. Bumba, Pharmaz. Z'halle 96, 3 (1957).

LEBENS LAUF

Am 24.2.1924 wurde ich als Sohn des Dipl.-Ing. Harald Joachim Dibbern und dessen Ehefrau Irmela, geb. Kleinknecht in Einsingen Kr. Ulm/Donau geboren. Von 1932 bis 1937 besuchte ich zunächst eine Privat- später die staatliche Volksschule in Stuttgart und von 1937 bis zu meiner Einberufung 1943 das Reformrealgymnasium in Stuttgart. Von dieser Schule erhielt ich das Reifezeugnis zuerkannt. Von Januar 1943 bis September 1945 leistete ich Kriegsdienst beim Heer und wurde mehrmals schwer verwundet. Nach Entlassung aus französischer Kriegsgefangenschaft trat ich am 1.10.1945 als Praktikant in der Stadtapotheke Metzingen (Württ.) ein und bestand im März 1947 das pharmazeutische Vorexamen.

Im Sommersemester 1947 begann ich das Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen und legte dort im April 1950 die Pharmazeutische Prüfung ab.

Nach Ableistung der Kandidatenzeit trat ich am 1.6.1951 bei den Farbwerken Hoechst A.G. ein, wo ich seither im Pharmazeutischen Untersuchungslabor tätig bin.

Im August 1960 begann ich mit der Bearbeitung der vorliegenden Dissertation unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Rochelmeyer. Sie wurde im oben genannten Laboratorium überwiegend in der dienstfreien Zeit durchgeführt.

